

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



OBTENCIÓN DE LA INSULINA HUMANA EN CEPAS DE *Pichia pastoris*

Por:

MC. ABEL CABALLERO PÉREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
con Orientación en Biotecnología

2021

# OBTENCIÓN DE LA INSULINA HUMANA EN CEPAS DE *Pichia pastoris*

## Comité de Tesis



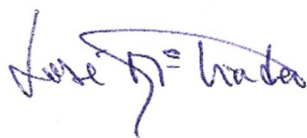
---

Dra. Martha Guerrero Olazarán  
Presidente



---

Dr. Juan Antonio Gallegos López  
Secretario



---

Dr. José María Viader Salvadó  
Vocal 1



---

Dra. Azucena del Carmen González Horta  
Vocal 2



---

Dra. Dvorak Montiel Condado  
Vocal 3



---

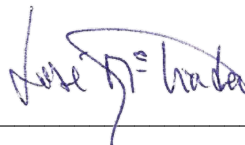
Dra. Katiushka Arévalo Nino  
Subdirector de Posgrado

OBTENCIÓN DE LA INSULINA HUMANA EN CEPAS DE *Pichia pastoris*



---

Dra. Martha Guerrero Olazarán  
Director



---

Dr. José María Viader Salvadó  
Co-Director

## **AVISOS DERECHOS DE AUTOR**

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.



## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL, CN 926-19.

Parte del presente trabajo ha sido presentado en forma de cartel en los siguientes congresos y evento:

Abel Caballero-Pérez, José María Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán. “Factibilidad técnica-económica de un proceso para la producción de insulina en *Pichia pastoris*”. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 25-30 de junio de 2017.

Abel Caballero-Pérez, José María Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán. “Expresión y Purificación del Precursor Monomérico de Insulina Glargina en *Pichia pastoris*”. XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. León, Guanajuato, México. 23-28 de junio de 2019.

Abel Caballero-Pérez. Ponente de la conferencia “Obtención de la insulina humana en cepas de *Pichia pastoris*”. Simposio de Bioquímica. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca. Ciudad Valles, SLP, México. 2-6 de diciembre de 2019.

Abel Caballero-Pérez. Ponente de la conferencia “La insulina humana: historia y producción”. Seminario de investigación del posgrado en ciencias químicas. Facultad de Ciencias Químicas. UASLP, México. 19 de abril de 2021.

Además, ha sido publicado en la revista “Applied Biochemistry and Biotechnology” (<https://www.springer.com/journal/12010/>).

Caballero-Pérez A, Viader-Salvadó JM, Herrera-Estala AL, Fuentes-Garibay JA, Guerrero-Olazarán M. Buried Kex2 Sites in Glargine Precursor Aggregates Prevent Its Intracellular Processing in *Pichia pastoris* Mut<sup>s</sup> Strains and the Effect of Methanol-Feeding Strategy and Induction Temperature on Glargine Precursor Production Parameters [published online ahead of print, 2021 Apr 30]. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021;10.1007/s12010-021-03567-z. doi:10.1007/s12010-021-03567-z

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca que permitió realizar este proyecto. Beca otorgada No. 615675.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, México por su apoyo financiero. Beca número CN926-19, PAICYT.

A la Dra. Martha Guerrero Olazarán, por aceptarme como estudiante y permitir ser parte del equipo de trabajo durante estos años, por sus orientaciones y enseñanzas.

Al Dr. José María Viader Salvadó, por sus observaciones en todo momento, su entrega y enseñanzas.

A la Madrina (Finita), que siempre ha estado al pendiente.

A la Dra. Socorro, por su constante atención a nuestra familia.

A los profesores del IB que tanto me ayudaron: Dr. Benito, Dra. Miriam, Dra. Isela, Dra. Katiushka, Dr. Galán, Dra. Verónica, Dra. Azucena, Ing. Falcón...

A mis compañeros de generación del Doctorado: Andrés, Lupita, Laurita, Héctor, Rodrigo y Arelis.

A mis compañeros del laboratorio David Gutiérrez, Ana Herrera, Dr. José Antonio, Noé, Yanelis Robaina, Karla Fernández, Mariana Sánchez, Alber, Everardo, Fabián, Rebeca, Daniela, Daniel, Diana.

A los que no me han podido acompañar en todo este tiempo, que han dado lo mejor de sí para mí, los llevo conmigo.

## **DEDICATORIAS**

A mi madre, que está en el cielo

A mis hijos, espero que les sirva de ejemplo

A Nancita, mi esposa, que me ha acompañado durante la mitad de mi vida

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA .....	xix
LISTADO DE ECUACIONES .....	xxii
RESUMEN.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES .....	3
2.1 Diabetes y prevalencia.....	3
2.2 Tratamiento de la diabetes mellitus.....	4
2.3 Insulina .....	6
2.3.1 Molécula de insulina humana (descripción química).....	6
2.3.2 Análogos de insulina (Glargina) .....	9
2.4 Industria biotecnológica .....	12
2.5 <i>Pichia pastoris</i> ( <i>Komagataella phaffii</i> ) como organismo modelo para la producción de proteínas recombinantes .....	14
2.5.1 Importancia .....	14
2.5.2 Promotores de la enzima alcohol oxidasas.....	15
2.5.3 Fenotipos de utilización de metanol (Mut) .....	15
2.6 Sistema de expresión de <i>Pichia pastoris</i> .....	16
2.6.1 Cepas .....	16
2.6.2 Vectores.....	18
2.7 Bioprocesos con <i>Pichia pastoris</i> .....	19
2.8 Condiciones de cultivo en los bioprocesos con <i>Pichia pastoris</i> .....	23
2.8.1 El valor de pH .....	24
2.8.2 Aireación y oxígeno disuelto .....	24
2.8.3 Temperatura .....	25
2.8.4 Concentración de metanol en el medio de cultivo .....	25
2.8.5 Densidad celular al inicio de la inducción .....	26
2.8.6 Velocidad específica de crecimiento y cinética de producción .....	26
2.8.7 Efectos multifactoriales de las condiciones de cultivo .....	27
2.9 Secreción de proteínas en <i>Pichia pastoris</i> .....	27
2.9.1 Remoción del péptido señal para la secreción de la proteína heteróloga .....	30

2.9.2	La endo-proteasa Kex2 y su interacción con la insulina glargina.....	30
2.10	Expresión de insulina en levaduras ( <i>Pichia Pastoris</i> ).....	33
2.11	Mercado de las insulinas .....	38
2.11.1	Mercado global.....	38
2.11.2	Mercado en México.....	41
3	JUSTIFICACIÓN .....	43
4	HIPÓTESIS .....	44
5	OBJETIVO .....	45
6	MATERIAL Y METODOS .....	46
6.1	Cepas, plásmidos, composición de medios, reactivos químicos y enzimas	46
6.2	Equipos principales .....	47
6.3	Estrategia general .....	47
6.4	Definición de las características de un proceso escalable y económicamente rentable para la producción de insulina humana en el sistema de expresión de <i>Pichia pastoris</i> .....	50
6.4.1	Proyecciones de producción.....	50
6.4.2	Infraestructura .....	51
6.4.3	Factibilidad económica .....	51
6.4.4	Selección de la variante farmacéutica de insulina.....	52
6.5	Diseño y construcción de un sistema de expresión en <i>Pichia pastoris</i> para una producción escalable y económicamente rentable de insulina humana glargina ...	52
6.5.1	Diseño de la secuencia codificante de la insulina glargina y definición de la estrategia de clonación .....	52
6.5.1.1	Diseño de la secuencia codificante de la glargina .....	52
6.5.1.2	Estrategia de clonación .....	52
6.5.2	Construcción del plásmido pPIC9ILGXN .....	53
6.5.3	Construcción de las cepas de <i>Pichia pastoris</i> portadoras de la secuencia codificante para ILGXN .....	71
6.5.4	Caracterización genotípica de las cepas recombinantes <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN .....	75
6.5.5	Caracterización fenotípica de las cepas recombinantes <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN .....	77
6.5.5.1	Cultivos en matraz agitado a 96 h de inducción .....	77
6.5.5.2	Determinación de concentración de proteínas totales (Método de Bradford)	78
6.5.5.3	Análisis de proteínas por SDS-PAGE .....	80

6.5.5.4	Análisis de proteínas por RP-HPLC .....	82
6.5.5.5	Análisis mediante espectrometría de masas.....	83
6.5.6	Cultivos en matraz agitado y selección de la cepa sobre-productora...	83
6.5.7	Cinéticas de crecimiento comparativas en condiciones de inducción del gen heterólogo .....	85
6.6	Diseño e implementación de un proceso para la producción escalable y económicamente rentable de la insulina glargina con el sistema de expresión de <i>Pichia pastoris</i> construido.....	87
6.6.1	Estrategia de cultivos en biorreactor de 7 L.....	87
6.6.2	Generación de inóculos para cultivos en biorreactor .....	88
6.6.3	Cultivo en lote en glicerol.....	89
6.6.4	Cultivo de lote alimentado con glicerol .....	90
6.6.5	Cultivo en lote alimentado con metanol .....	90
6.6.6	Determinación de parámetros fisiológicos de los cultivos en biorreactor	91
6.6.6.1	Determinación de crecimiento celular .....	91
6.6.6.2	Velocidad específica de crecimiento .....	92
6.6.6.3	Determinación de rendimiento celular proveniente del metanol ( $Y_{x/s}$ )	92
6.6.6.4	Determinación de rendimiento de producción extracelular de insulina glargina/biomasa ( $Y_{p/x}$ ).....	93
6.6.6.5	Determinación de rendimiento de producción extracelular de insulina glargina proveniente de metanol ( $Y_{p/s}$ ).....	93
6.6.6.6	Velocidad específica de producción del precursor de insulina o productividad específica.....	93
6.6.6.7	Velocidad específica de consumo de sustrato.....	94
6.7	Purificación y caracterización del producto recombinante de insulina glargina	94
6.8	Niveles de expresión del gen <i>KEX2</i> .....	94
6.9	Modelos moleculares computacional para la insulina glargina monocatenaria	96
6.10	Análisis estadístico .....	96
7	RESULTADOS .....	98
7.1	Estudio de factibilidad técnica y económica para la producción de insulina glargina en el sistema de expresión de <i>Pichia pastoris</i> .....	98
7.2	Diseño de la secuencia nucleotídica <i>ILGXN</i> que codifica para la expresión y producción de la insulina glargina.....	105

7.3	Construcción del vector pPIC9ILGXN .....	107
7.4	Construcción de la cepa recombinante de <i>Pichia pastoris</i> KM71 Mut <sup>s</sup> pPIC9ILGXN .....	117
7.5	Caracterización genotípica de las cepas recombinantes <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN construidas.....	119
7.6	Caracterización fenotípica de las cepas recombinantes <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN construidas.....	122
7.7	Cultivos en matraz bajo condiciones de inducción del gen heterólogo y selección de la cepa KM71ILGXN sobre-productora.....	128
7.8	Cinética de crecimiento .....	134
7.9	Cultivos en biorreactor .....	135
7.10	Análisis de expresión del gen <i>KEX2</i> .....	140
7.11	Purificación y caracterización del producto recombinante .....	141
7.12	Costos de la producción de insulina con el proceso desarrollado .....	143
7.13	Modelos moleculares para la insulina glargina monocatenaria.....	145
8	DISCUSIÓN .....	147
9	CONCLUSIONES.....	161
10	PERSPECTIVAS .....	163
11	APÉNDICES.....	164
11.1	Preparación de medios, soluciones y reactivos .....	164
11.2	Información del plásmido pUC57ILGXN.....	170
11.3	Tablas de los cálculos económicos.....	174
11.4	Resultados del análisis estadístico.....	177
12	BIBLIOGRAFÍA .....	180
13	RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	189



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación de las modificaciones entre la insulina humana y sus análogos. .....	10
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>P. pastoris</i> utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes. .....	17
<b>Tabla 3.</b> Vectores de expresión empleados para la producción de proteínas heterólogas en <i>Pichia pastoris</i> . ....	19
<b>Tabla 4.</b> Expresión de insulina en cepas de <i>Pichia pastoris</i> . ....	35
<b>Tabla 5.</b> Principales compañías que fabrican y comercializan insulina. ....	40
<b>Tabla 6.</b> Secuencia de los pasos a seguir para la extracción y purificación del ADN plasmídico. ....	58
<b>Tabla 7.</b> Tamaños teóricos esperados para la caracterización de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S con las enzimas de restricción XhoI y NotI. ....	59
<b>Tabla 8.</b> Mezcla de la reacción de la digestión enzimática de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S, a escala analítica, con las enzimas de restricción XhoI y NotI. ....	60
<b>Tabla 9.</b> Mezcla de la reacción de la digestión enzimática de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S, a escala preparativa, con las enzimas de restricción XhoI y NotI. ....	62
<b>Tabla 10.</b> Mezcla de reacción para realizar la ligación entre el inserto <i>ILGXN</i> y el vector pPIC9. ....	65
<b>Tabla 11.</b> Tamaños teóricos esperados para la caracterización del plásmido pPIC9ILGXN con las enzimas de restricción XhoI y NotI. ....	67
<b>Tabla 12.</b> Mezcla de las reacciones de digestión enzimática del plásmido pPIC9ILGXN con las enzimas de restricción XhoI y NotI. ....	68
<b>Tabla 13.</b> Volumen y concentración final, para una sola reacción, de los reactivos empleados en la PCR para caracterizar el ADN plasmídico y genómico de pPIC9ILGXN. ....	69
<b>Tabla 14.</b> Condiciones del ensayo de la PCR para verificar la amplificación de la secuencia de ADN que codifica para el precursor de insulina glargina. ....	71
<b>Tabla 15.</b> Componentes y volúmenes de la mezcla para la reacción de la digestión enzimática de pPIC9ILGXN con SalI. ....	72

<b>Tabla 16.</b> Etapas de los cultivos celulares y condiciones experimentales en la inducción de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN.....	78
<b>Tabla 17.</b> Mezcla de reacción para conformar la curva de calibración utilizado en el método de Bradford.....	80
<b>Tabla 18.</b> Volúmenes y concentración final de los reactivos empleados para la preparación del gel separador de la SDS-PAGE.....	80
<b>Tabla 19.</b> Volúmenes y concentración final de los reactivos empleados para la preparación del gel concentrador de la SDS-PAGE. ....	81
<b>Tabla 20.</b> Insulinas adquiridas por el IMSS para los años 2014-2016.....	99
<b>Tabla 21.</b> Estimados del capital de inversión.....	103
<b>Tabla 22.</b> Resultados de la densidad celular al final del cultivo celular de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN para cinco clonas diferentes. ....	132
<b>Tabla 23.</b> Parámetros de crecimiento y producción celular para los tres cultivos en biorreactor con la cepa sobre-productora <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN Col.#77..	136
<b>Tabla 24.</b> Costo de producción del precursor de insulina glargina con el proceso productivo desarrollado a escala de laboratorio.....	143
<b>Tabla 25.</b> Capacidad y costo de producción con el bioproceso desarrollado.....	144
<b>Tabla 26.</b> Indicadores para el cálculo del valor actual neto (VAN). El dinero se expresa en pesos (MXN).....	174
<b>Tabla 27.</b> Cálculo de los costos directos de operación.....	175
<b>Tabla 28.</b> Cálculo de los costos indirectos de operación.....	176
<b>Tabla 29.</b> Valores de la Densidad Celular (DC) para los cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN con inducción a 48 h. ....	177
<b>Tabla 30.</b> Valores de la Concentración de proteínas totales extracelular para los cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN con inducción a 48 h.....	178
<b>Tabla 31.</b> Valores de Rendimiento (Proteína extracelular/biomasa) para los cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN con inducción a 48 h .....	179

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Perfil farmacocinético aproximado de la insulina humana e insulinas análogos.....	5
<b>Figura 2.</b> Secuencia primaria de insulina humana. ....	6
<b>Figura 3.</b> Estructuras terciarias de la insulina (código PDB 1MSO). ....	7
<b>Figura 4.</b> Proceso de transformación de la insulina. ....	8
<b>Figura 5.</b> Estructuras terciarias del dímero y hexámero de la insulina. ....	9
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de la disociación y absorción de la insulina glargina basal después de la administración subcutánea.....	11
<b>Figura 7.</b> Representación gráfica de la disponibilidad de diferentes tipos de insulinas (humana, animal y análogos) en las dos últimas décadas. ....	13
<b>Figura 8.</b> Esquema de un bioproceso automatizado con <i>Pichia pastoris</i> a alta densidad celular. ....	22
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de la vía de secreción de proteínas en levaduras .....	28
<b>Figura 10.</b> Matriz específica para la endo-proteasa Kex2 que muestra la secuencia de los sitios de corte, basados en los datos de 191 reportes.....	32
<b>Figura 11.</b> Estrategia general del proyecto.....	49
<b>Figura 12.</b> Metodología general para el análisis técnico-económico de un proceso industrial para la producción de una proteína recombinante en <i>Pichia pastoris</i> . ....	51
<b>Figura 13.</b> Esquema de la estrategia general para la construcción del plásmido pPIC9ILGXN. ....	53
<b>Figura 14.</b> Esquema del procedimiento de transformación de las células de <i>E. coli</i> TOP10 calcio-competentes con el plásmido pUC57ILGXN. ....	55
<b>Figura 15.</b> Esquema de la ligación del inserto <i>ILGXN</i> y el vector pPIC9.....	66
<b>Figura 16.</b> Reacciones de la PCR para verificar la presencia del ADN plasmídico en las clonas de <i>E. coli</i> TOP10 pPIC9ILGXN.....	70
<b>Figura 17.</b> Representación gráfica de una región del plásmido pPIC9ILGXN. ....	76
<b>Figura. 18.</b> Metodología desarrollada para la selección de las cepas de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN productoras del precursor de insulina glargina. ....	84
<b>Figura 19.</b> Estimación del mercado de insulina humanas. ....	98

<b>Figura 20.</b> Dependencia entre el volumen efectivo de fermentación y la concentración de insulina glargina secretada al medio de cultivo con la cantidad de lotes necesarios para satisfacer la demanda anual del IMSS.....	101
<b>Figura 21.</b> Distribución del coste del capital.....	102
<b>Figura 22.</b> Estructura de los costos directos de operación para la fabricación de insulina humana en el modelo de <i>Pichia pastoris</i> .....	104
<b>Figura 23.</b> Valor Actual Neto (VAN) para el proyecto de obtención de la insulina humana en cepas de <i>P. pastoris</i> para satisfacer una parte del sector del mercado del IMSS. ....	105
<b>Figura 24.</b> Construcción de la cepa KM71 Mut <sup>s</sup> pPIC9ILGXN de <i>P. pastoris</i> .....	106
<b>Figura 25.</b> Fotos del crecimiento celular de <i>E. coli</i> TOP10 calcio competente posterior al paso de transformación celular.....	107
<b>Figura 26.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para caracterizar el plásmido pUC57ILGXN purificado de las células de <i>E. coli</i> TOP10. ....	108
<b>Figura 27.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para caracterizar el plásmido pUC57ILGXN purificado de las células de <i>E. coli</i> JM109.....	109
<b>Figura 28.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S y un mapa de restricción. ....	110
<b>Figura 29.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a escala preparativa luego de la purificación de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S y una digestión enzimática con las enzimas de restricción XhoI y NotI. ....	111
<b>Figura 30.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del inserto <i>ILGXN</i> y vector pPIC9 purificados.....	112
<b>Figura 31.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% posterior al ensayo de ligación. ....	113
<b>Figura 32.</b> Fotografía del resultado posterior al paso de transformación celular de <i>Escherichia coli</i> TOP10 y controles del ensayo. ....	114
<b>Figura 33.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para caracterizar el plásmido pPIC9ILGXN purificado de las células de <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	115
<b>Figura 34.</b> Caracterización por PCR de pPIC9ILGXN.....	116
<b>Figura 35.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% luego de la purificación a escala preparativa del plásmido pPIC9ILGXN a partir de células de <i>Escherichia coli</i> TOP10 pPIC9ILGXN. ....	117

<b>Figura 36.</b> Fotografía del resultado posterior al paso de transformación de las células de <i>Pichia pastoris</i> KM71 Mut <sup>s</sup> electro-competentes y controles del ensayo.....	118
<b>Figura 37.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% realizado para detectar el producto amplificado por PCR para caracterizar las colonias de <i>Pichia pastoris</i> KM71 pPIC9ILGXN. ....	119
<b>Figura 38.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% realizado posterior al ensayo de PCR para caracterizar el plásmido pPIC9ILGXN obtenido de una colonia al azar de <i>Escherichia coli</i> TOP10 pPIC9ILGXN y verificar la integración del casete de expresión en el genoma de <i>Pichia pastoris</i> KM71 pPIC9ILGXN Col.#77.....	120
<b>Figura 39.</b> Resultado del análisis “ <i>in silico</i> ” de la región de hibridación de los iniciadores 5’AOX1 y 3’ILGXN en el plásmido pPIC9ILGXN. ....	121
<b>Figura 40.</b> Cinética de crecimiento de un transformante de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN seleccionado al azar y crecida en presencia de metanol.....	122
<b>Figura 41.</b> Comparación de los perfiles cromatográficos de filtración en gel de las muestras de sobrenadante de un cultivo celular durante una cinética de crecimiento. ....	123
<b>Figura 42.</b> Análisis de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. ....	124
<b>Figura 43.</b> Estimación del peso molecular del precursor de insulina glargina. ....	125
<b>Figura 44.</b> Perfiles cromatográficos de fase reversa en HPLC. ....	126
<b>Figura 45.</b> Análisis de espectros de masas MALDI-TOF.....	127
<b>Figura 46.</b> Crecimiento celular de las 80 clonas de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN. ....	128
<b>Figura 47.</b> Concentración de proteínas totales extracelulares de las 80 clonas de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN.....	129
<b>Figura 48.</b> Rendimiento de proteína extracelular/biomasa de las 80 clonas de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN.....	130
<b>Figura 49.</b> Rendimiento de proteína extracelular/biomasa en función de la concentración de proteínas totales para las 80 clonas de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN. ....	131
<b>Figura 50.</b> Rendimiento de proteína extracelular/biomasa de cinco clonas de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN.....	133
<b>Figura 51.</b> Cinéticas de crecimiento para KM71ILGXN Col.#77 y KM71pPIC9 en matraces de agitación. ....	134

<b>Figura 52.</b> Cinética del crecimiento celular para los cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN Col. #77 Mut <sup>s</sup> para diferentes condiciones de cultivo.....	135
<b>Figura 53.</b> Cinética del consumo de metanol para los cultivos celulares de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN Col.#77 Mut <sup>s</sup> para diferentes condiciones de cultivo.....	137
<b>Figura 54.</b> Cinética del metanol residual para los cultivos celulares de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN Col.#77 Mut <sup>s</sup> para diferentes condiciones de cultivo.....	138
<b>Figura 56.</b> Comparación de los niveles de expresión relativo del gen <i>KEX2</i> en los cultivos MNLFB a 24 y 28°C. ....	140
<b>Figura 57.</b> Cromatografía de filtración en gel Sephadex G25 para el sobrenadante de cultivo libre de células de la fermentación MNLFB 24°C.....	141
<b>Figura 58.</b> Cromatograma de intercambio catiónico del medio de cultivo libre de células luego de un cambio de solución tampón. ....	142
<b>Figura 59.</b> Representación de superficie del precursor de insulina glargina monocatenario. ....	146

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados, unidad de medida de la temperatura
aa	Aminoácido
Amp.	Ampicilina
AOX	Alcohol oxidasa
<i>AOX1</i>	Gen codificante para la alcohol oxidasa 1
ASB	Albúmina sérica bovina
ATP	Adenosin trifosfato
BCT	Banco de células de trabajo
BMG	Medio mínimo amortiguado con glicerol
BM	Medio mínimo amortiguado sin metanol
BMM	Medio mínimo amortiguado con metanol
BSA	Albúmina de suero bovino
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
Col.	Colonia de células
Ct	Ciclo umbral de fluorescencia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
DO <sub>600nm</sub>	Densidad óptica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
EE.UU.	Estados Unidos de Norte América
<i>et al.</i>	“Et alii”: y otros
ETOH	Alcohol etílico
FID	Federación Internacional de la Diabetes
x g	Número de veces la fuerza gravitacional
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
GRAS	“Generally recognized as safe”: Generalmente reconocido como seguro
h	Unidad de medida de tiempo en horas
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
His <sup>+</sup>	Fenotipo <i>HIS4</i> positivo
<i>HIS4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa defectuoso o mutado
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase = Mil pares de bases (10 <sup>3</sup> pb)

kDa	Kilodaltones ( $10^3$ Da)
Kex2	Serin-proteasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}$ unida a membrana
KM71FTEII	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de una fitasa termoestable
KM71GAHFTEII	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de una fitasa termoestable regulada por el promotor constitutivo <i>GAP</i>
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
m	Metro: Unidad de medida fundamental del sistema internacional de unidades
M	Cantidad de materia, expresada en unidades del SI de medida (mol).
mA	Miliamperes
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mg/L	Miligramos por litro
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minutos
MLFB	Metanol límite en lote alimentado
mM	Concentración milimolar ( $10^{-3}$ M)
NRRL	El Laboratorio de Investigación Regional del Norte: Es un laboratorio del Centro Nacional para la Investigación de la Utilización Agrícola, que investiga y almacena más de 99000 cepas de bacterias y hongos.
MNLFB	Metanol no límite en lote alimentado
Mut	Fenotipo de utilización de metanol
Mut <sup>s</sup>	Mutante que carece del gen <i>AOX1</i> funcional
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ng	Nanogramos ( $10^{-9}$ g)
nm	Nanómetro ( $10^{-9}$ m)
NL	Nuevo León
OMS	Organización mundial de la salud
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
PIB	Producto interno bruto
PSA	Persulfato de amonio.
RE	Retículo endoplásmico
RDB	Regeneración base de dextrosa
RP-HPLC o HPLC-RP	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes



SEVAG	Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1
SMC	Sitio múltiple de clonación
SOC o SOB	“Super Optimal Broth”: Medio de crecimiento bacteriano rico en nutrientes utilizado para el cultivo microbiológico, generalmente de <i>Escherichia coli</i>
Sol I	Tris-HCl, EDTA y glucosa
Sol. II	Solución de lisis celular
Sol. III	Solución neutralizante
TA	Temperatura ambiente (22-24°C)
TBE	Solución amortiguadora (Tris/ácido bórico/EDTA)
TE	Solución amortiguadora (Tris/EDTA)
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TIR	Tasa interna de retorno
TSNT	Solución amortiguadora de lisis
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UI	Unidades internacionales
USD	“United state dollars”
UV	Luz ultravioleta
VAN/VPN	Valor actual neto/Valor presente neto
vs	“versus”
RBD	Base de dextrosa de regeneración
RBD His <sup>-</sup>	Base de dextrosa de regeneración sin Histidina
DCW	Densidad celular húmeda
PDB	“Protein data bank”
PTM 1	Solución de sales traza
HEPES	(ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico) es un agente tampón de ácido sulfónico de ion híbrido
PSA	Persulfato de amonio
TEMED	La tetrametiletilendiamina, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TD	Tiempo de duplicación celular
IMSS	El Instituto Mexicano del Seguro Social
TFA	Ácido trifluoroacético
FBS	Solución tampón con sales basales
YNB	Base nitrogenada de levaduras
YPD	Extracto de levadura-peptona-dextrosa
Y <sub>p/x</sub>	Rendimiento de la producción extracelular de glargina/biomasa
Y <sub>p/s</sub>	Rendimiento de la producción de glargina proveniente de metanol
Y <sub>x/s</sub>	Rendimiento celular proveniente de metanol

## LISTADO DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Cálculo de la cantidad del inserto <i>ILGXN</i> y el vector pPIC9 para realizar la ligación. ....	64
<b>Ecuación 2.</b> Ecuación que describe el crecimiento exponencial de las células de <i>Pichia pastoris</i> en medios de cultivo YPD y BMG. ....	85
<b>Ecuación 3.</b> Cálculo del tiempo de duplicación para las cepas de <i>Pichia pastoris</i> evaluadas condiciones de inducción del gen heterólogo.....	86
<b>Ecuación 4.</b> Calculo para obtener la densidad celular (g/L) para los cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN en el biorreactor.....	91
<b>Ecuación 5.</b> Cálculo de la biomasa en gramos de células secas para los cultivos de <i>Pichia pastoris</i> KM71ILGXN en el biorreactor. ....	92
<b>Ecuación 6.</b> Ecuación exponencial (DC vs. t) utilizada para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). ....	92
<b>Ecuación 7.</b> Ecuación lineal ( $X_t$ vs. $S_t$ ) utilizada para calcular el rendimiento biomasa/sustrato (g/g). ....	92
<b>Ecuación 8.</b> Ecuación lineal ( $P_t$ vs. $X_t$ ) utilizada para calcular el rendimiento producto/biomasa (mg/g). ....	93
<b>Ecuación 9.</b> Ecuación lineal ( $P_t$ vs. $S_t$ ) utilizada para calcular el rendimiento producto/sustrato (mg/g). ....	93
<b>Ecuación 10.</b> Cálculo de la velocidad específica de producción del precursor de insulina glargina. ....	93
<b>Ecuación 11.</b> Cálculo de la velocidad específica de sustrato. ....	94
<b>Ecuación 12.</b> Cálculo de la cantidad de proteína precursor de insulina glargina en un fermentador. ....	99
<b>Ecuación 13.</b> Cálculo de la cantidad de proteína precursor de insulina glargina en un número de lotes. ....	100
<b>Ecuación 14.</b> Cálculo para estimar el volumen necesario de fermentación para producir las cantidades de insulina glargina según la demanda del sector del mercado de interés. ....	100

## RESUMEN

La diabetes mellitus es un problema de salud pública a nivel mundial cuyo tratamiento depende en gran medida de la aplicación de insulina humana o sus análogos. En este trabajo, se desarrolló una proyección técnico-económica con el fin de diseñar un proceso económicamente rentable y escalable para la producción de insulina humana en el sistema de expresión de *P. pastoris*. El estudio de factibilidad técnica-económica indicó que, bajo determinadas consideraciones del bioproceso, la fabricación de la insulina glargina puede ser técnica y económicamente factible de operar. Así en este trabajo se construyeron cepas de *Pichia pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> para producir y secretar al medio de cultivo la insulina glargina correctamente procesada a través de la ruptura del polipéptido prepro-factor alfa/glargina por la endo-proteasa Kex2. Los resultados mostraron que el producto recombinante obtenido fue la insulina glargina de una cadena en lugar de la esperada glargina de doble cadena. Un análisis a través de modelos moleculares mostró que el sitio potencial de corte de la glargina de una cadena por la endo-proteasa Kex2 está oculto en el interior de los complejos diméricos y hexaméricos, lo cual impidió el procesamiento intracelular del precursor de glargina. Se evaluaron tres estrategias de cultivo a nivel de biorreactor dependientes de la alimentación de metanol y la temperatura. Los resultados mostraron que el cultivo bajo condiciones de alimentación con metanol no limitado a 24°C presentó los valores más altos de productividad volumétrica ( $Q_p$ ), rendimiento producto/biomasa ( $Y_{p/x}$ ) y velocidad específica de formación de producto ( $q_p$ ), con una producción volumétrica 0.122 g/L de precursor de glargina en el medio de cultivo a las 75 h de inducción. Por último, se desarrolló un proceso de purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico y se obtuvo un producto homogéneo con pureza superior al 98%.

En conclusión, en este trabajo se desarrolló un bioproceso a nivel de laboratorio y escalable para la producción del precursor de insulina glargina con una alta pureza. El proceso desarrollado y proyectado a la escala industrial podría satisfacer el 34% de la demanda anual de insulina glargina para el IMSS. Se estimó que el costo para obtener el precursor de insulina glargina podría ser de hasta 70 veces menor que el precio de este producto en el mercado nacional. Finalmente, se tiene un prototipo de un proceso, a nivel de laboratorio, para la producción de la insulina glargina.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a worldwide public health problem whose treatment depends largely on the application of human insulin or its analogs. In this work, a technical-economic projection was developed to design an economically profitable and scalable process for the production of human insulin in the expression system of *P. pastoris*. The technical-economic feasibility study indicated that, under specific bioprocess considerations, the manufacture of insulin glargine may be technically and economically feasible to operate. Thus, in this work, *Pichia pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> strains were constructed to produce and secrete correctly processed insulin glargine to the culture medium through the cleavage of the prepro-factor alpha/ghargine polypeptide by the Kex2 endo-protease. The results showed that the recombinant product obtained was the single-chain insulin glargine instead of the expected double chain glargine. Molecular models analysis showed that the potential cleavage site of the single-chain glargine by the endo-protease Kex2 was buried within the dimeric and hexameric complexes, which prevented the intracellular processing of the glargine precursor. Three strategies were evaluated for bioreactor cultures depending on methanol feeding and temperatures. The results showed that the non-limited methanol feeding at 24°C condition presented the highest values of volumetric productivity ( $Q_p$ ), product/biomass yield ( $Y_{p/x}$ ) and specific product formation rate ( $q_p$ ), with a volumetric glargine precursor production of 0.122 g/L in the culture medium at 75 h of induction. Finally, a purification process was developed by cation exchange chromatography, and a homogeneous product with 98% purity was obtained.

In conclusion, in this work, a scalable, laboratory-scale bioprocess was developed for the production of high purity insulin glargine precursor. The process developed and projected on an industrial scaled could satisfy 34% of the annual IMSS demand for insulin glargine. It was estimated that the cost to obtain the insulin glargine precursor could be up to 70 times less than the price of this product in the domestic market. Finally, it was developed a prototype process, at the laboratory-scale, for the production of insulin glargine.

# 1 INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una afección grave a largo plazo con un importante impacto en la vida y el bienestar de las personas, familias, y sociedades en todo el mundo. Se ha estimado que el número mundial de casos de DM ronda los 463 millones y se espera que aumente a 700 millones en el 2045 (Saeedi *et al.*, 2019). La Federación Internacional de la Diabetes estimó 12.8 millones de diabéticos para México en el 2019 y la cifra se incrementará hasta 22.3 millones en el 2045 (<http://www.idf.org/>). La DM es la segunda causa de muerte en el país (<https://www.inegi.org.mx/>). El tratamiento de la hiperglucemia crónica con insulina o análogos de insulina es indispensable para la supervivencia de millones de personas.

Con el incremento de casos de diabéticos en las últimas décadas, la demanda de este medicamento se ha incrementado (Wirtz *et al.*, 2016). El desarrollo de la industria biotecnológica ha demostrado la utilidad de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) como modelo para la producción y comercialización de proteínas heterólogas. *P. pastoris* tiene un promotor fuerte y estrictamente regulado derivado del gen de la alcohol oxidasa (*AOX1*), que puede inducirse con metanol, esto lo hace apropiado para el control de la expresión de genes heterólogos (Creeg *et al.*, 2018). Además, el control de la estrategia de alimentación de metanol y la temperatura en la etapa de inducción-producción es crucial para aumentar los niveles de producción de proteínas recombinantes (Looser *et al.*, 2015; Barrigón *et al.*, 2013).

En este trabajo, se desarrolló una proyección técnico-económica con el fin de diseñar un proceso económicamente rentable y escalable para la producción de insulina glargina en el sistema de expresión de *P. pastoris*. Se diseñaron y construyeron cepas de *P. pastoris* capaces de secretar al medio de cultivo la insulina glargina a través de la ruptura por la endo-proteasa Kex2 de dos sitios potencialmente de corte presente en la secuencia aminoacídica del polipéptido prepro factor alfa/glargina. Se evaluó el efecto de las estrategias de alimentación limitada o no limitada de metanol y la temperatura (28°C y 24°C) durante la etapa de inducción sobre el crecimiento celular y los parámetros de producción en cultivos de biorreactor. Se desarrolló un proceso de purificación para la obtención de la proteína recombinante con alto nivel de homogeneidad y pureza.

El análisis económico indicó que, bajo determinadas consideraciones del bioproceso, es posible fabricar el ingrediente farmacéutico activo de la insulina

glargina en condiciones técnica y económicamente factible. Los ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas mostraron que, el producto recombinante obtenido fue la insulina glargina de cadena sencilla (precursor de insulina glargina). Se propuso un modelo molecular de las formas dimérica y hexamérica del precursor de insulina glargina que mostró que el sitio de ruptura por la endo-proteasa Kex2 en el precursor de glargina estaba oculto, lo cual impidió el procesamiento del precursor de glargina intracelular. En el cultivo con metanol no limitado a 24°C presentó los valores más altos de productividad volumétrica ( $Q_p$ ), rendimiento producto/biomasa ( $Y_{p/x}$ ) y velocidad específica de formación de producto ( $q_p$ ), con una producción volumétrica 0.122 g/L de precursor de glargina en el medio de cultivo a las 75 h de inducción, condición en la que se presentaron los niveles más altos de la expresión del gen *KEX2* indicando el papel relevante de *KEX2* en la producción de este producto.

En conclusión, en este trabajo se desarrolló un bioproceso a nivel de laboratorio y escalable para la producción del precursor de insulina glargina con una pureza superior al 98%, el proceso desarrollado y proyectado a la escala industrial podría satisfacer el 34% de la demanda anual de insulina glargina para el IMSS. Se estimó que el costo para obtener el precursor de insulina glargina podría ser de hasta 70 veces menor que el precio de este producto en el mercado nacional. Finalmente, se tiene un prototipo de un proceso, a nivel de laboratorio, para la producción de la insulina glargina.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Diabetes y prevalencia

Según la Organización mundial de la Salud (OMS) la diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre) (<https://www.who.int/es>). Esta enfermedad crónica se desencadena cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no puede utilizar eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula el nivel de azúcar o glucosa en la sangre. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia, que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas.

La diabetes era conocida desde antes de la era cristiana. En el papiro de Ebers, uno de los tratados médicos más antiguos que fue redactado en el siglo XV antes de Cristo, se describen síntomas que parecen corresponder a la diabetes (Sanchez-Rivero, 2007). En la actualidad la DM es un importante problema de salud pública a nivel mundial, es una enfermedad grave a largo plazo con un gran impacto en la vida y el bienestar de las personas, las familias y las sociedades. Se encuentra entre las 10 principales causas de muerte en adultos y se estima que causó cuatro millones de muertes en todo el mundo en 2017 (Ogurtsova *et al.*, 2017). En 2019, el gasto sanitario mundial en diabetes se estimó superior a los 760 mil millones de USD (Williams *et al.*, 2020). Específicamente en México el gasto sanitario total debido a la DM, en edades comprendidas entre 20 a 79 años en 2019, se estimó en 17 mil millones de USD (Williams *et al.*, 2020).

Según la Federación Internacional de la Diabetes (FID) el número mundial de casos de DM ronda los 463 millones en 2019, un número que se espera aumente a 700 millones para 2045 (Saeedi *et al.*, 2019). México representa el sexto lugar a nivel mundial por cantidad de adultos (20-79 años) con DM y la FID estimó 12.8 millones de personas diabéticas (Saeedi *et al.*, 2019).

Durante las últimas décadas el número de personas que padecen de DM en México se ha incrementado. La DM es una enfermedad de alta prevalencia en el país, superior al 9% de la población adulta (Saeedi *et al.*, 2019) y es, sin duda alguna, el mayor reto que enfrenta el Sistema Nacional de Salud. Tomando en cuenta las principales causas generales de muerte, la DM representa la segunda causa de muerte en México (Soto-Estrada *et al.*, 2016) y continúa siendo así hoy día, según datos

actualizados de la secretaría de salud ([https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/498153/ANUARIO\\_MORTALIDAD\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/498153/ANUARIO_MORTALIDAD_2017.pdf), acceso en abril de 2021).

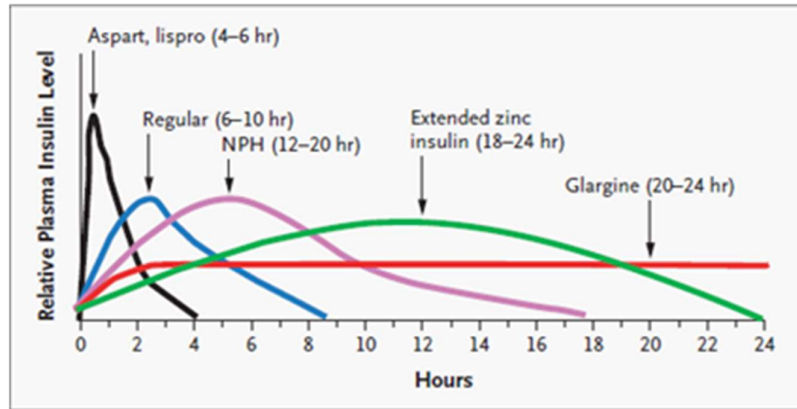
## **2.2 Tratamiento de la diabetes mellitus**

Para muchas personas que padecen de DM el único tratamiento farmacológico razonable es el reemplazo completo e inmediato del déficit de insulina. La insulinoterapia o terapia insulínica, se refiere al tratamiento de la DM mediante la administración de insulina exógena. La insulina es utilizada médicamente para el control del metabolismo de la glucosa circulante en el plasma sanguíneo.

Se considera que el descubrimiento de la insulina hace casi un siglo, ha sido uno de los mayores avances médicos del siglo XX (Rosenfeld, 2002). Desde el descubrimiento de la insulina en 1921 (Karamitsos, 2011), la DM pasó de ser de una enfermedad letal a una enfermedad crónica. Rápidamente se desarrollaron procesos de fabricación para extraer la insulina del páncreas porcino y bovino. Estas preparaciones fueron las primeras terapias con insulina, disponibles comercialmente. Sin embargo, efectos alérgicos, dificultades para obtener grandes cantidades en el suministro del producto debido a la creciente demanda del mercado (Kjeldsen, 2000) y las preocupaciones recientes sobre las encefalopatías espongiformes transmisibles asociadas con el uso de materiales de origen animal, fueron las principales razones de la eliminación del producto de esta naturaleza (Beals *et al.*, 2019). Así, todos los principales fabricantes de insulina han interrumpido la producción de estos productos, lo que marca el final del suministro futuro de productos de insulina de origen animal. Desde 1921 a 1980, los esfuerzos se dirigieron a aumentar la pureza de la insulina y proporcionar diferentes formulaciones para mejorar el control de la glucosa al alterar el tiempo de acción. El desarrollo de la formulación se centró en mejorar la estabilidad química pasando de formulaciones ácidas a neutras y modificando el perfil del tiempo de acción mediante el uso de aditivos (zinc y protamina) (Beals *et al.*, 2019).

El surgimiento de la tecnología de ADN recombinante permitió la producción de insulina humana a partir de microorganismos, como inicialmente se realizó en bacterias (Goeddel *et al.*, 1979) y luego en sistemas de expresión en levaduras (Thim *et al.* 1986). La evolución de esta tecnología condujo al incremento en la disponibilidad del producto a nivel mundial y ha mitigado los problemas con las limitaciones en el abastecimiento del producto, al tiempo que proporciona al paciente una fuente exógena de insulina nativa.





**Figura 1.** Perfil farmacocinético aproximado de la insulina humana e insulinas análogos. Se muestra la duración relativa de acción de las diversas formas de insulina. Figura tomada de Hirsch, 2005.

La insulina es una hormona polipeptídica, producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. En la actualidad, la insulina suele tener presentaciones que varían en base al tiempo de duración en sus efectos para controlar los aumentos de azúcar en la sangre (Figura 1).

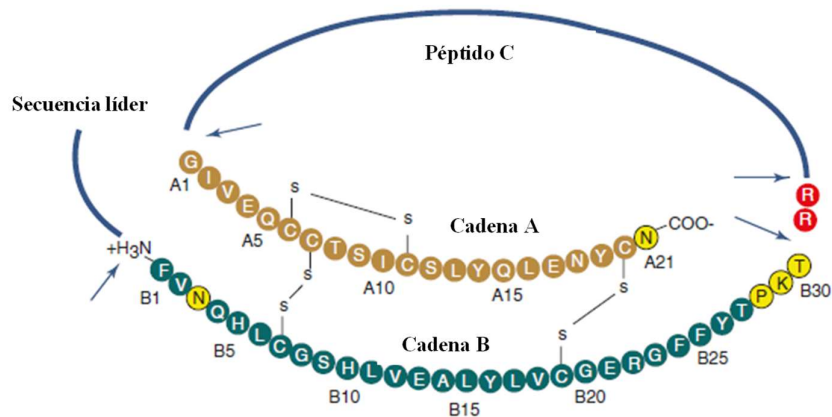
A nivel molecular, los análogos de insulina son moléculas diferentes de la insulina humana, solo en unos pocos aminoácidos (Tabla 1 y Figura 2). La producción y el uso de medicamentos genéricos ha mejorado sustancialmente el acceso a los medicamentos en los países de ingresos bajos y medios (Perrin *et al.*, 2017). Así, en la actualidad existen varios tipos de análogos de la insulina humana o insulina regular (Mesa, 2015):

- Insulinas de acción rápida (Lispro): Comienzan a actuar entre 5 y 15 minutos después de su inyección y permanecen activas entre 3 y 4 horas.
- Insulinas de acción intermedia (NPH): Comienza a actuar entre 1 y 3 horas después de su administración y permanece activa entre 14 y 16 horas. En estas variantes, la duración de la acción de la insulina se prolonga añadiendo una proteína básica llamada protamina.
- Insulinas de acción lenta o prolongada (Glargina): Comienzan a actuar entre 4 y 6 horas posteriores a su administración y permanecen activas hasta más de 32 horas.

## 2.3 Insulina

### 2.3.1 Molécula de insulina humana (descripción química)

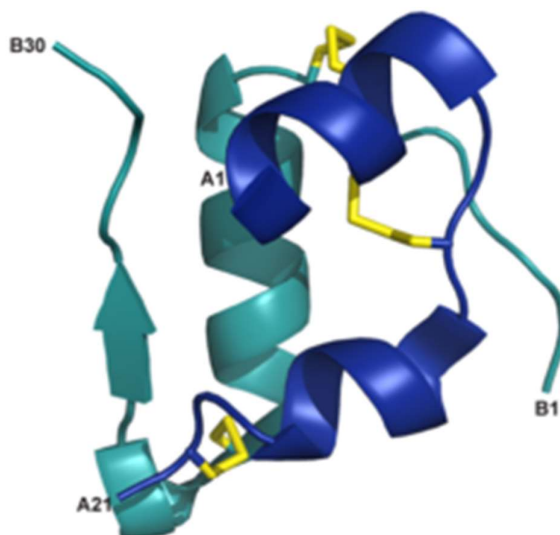
La insulina es la única hormona hipoglucemiante del organismo. Es una molécula pequeña: sólo contiene 254 átomos de carbono, 337 de hidrógeno, 65 de nitrógeno, 75 de oxígeno y 6 de azufre. Es una proteína globular de 51 aminoácidos, que se sintetiza como un precursor de proinsulina de cadena única, que contiene una secuencia líder, compuesta por dos cadenas polipeptídicas independientes, llamadas cadena A y B, y un péptido de conexión (péptido C) (Figura 2) (Beals *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Secuencia primaria de insulina humana. La cadena A se muestra en color canela. La cadena B se muestra en verde azulado. Los aminoácidos de color amarillo representan sitios de modificaciones de secuencia (Tabla 1). Las flechas indican sitios de procesamiento enzimático que eliminan la secuencia líder y el péptido de conexión (péptido C) de la proinsulina. No se muestran las secuencias del péptido líder y de conexión, con la excepción de los dos residuos de arginina (rojo) que se retienen en un análogo para alterar su acción temporal (insulina glargina). Figura tomada de Beals *et al.*, 2019.

La cadena-A está compuesta por 21 residuos de aminoácidos y la cadena-B por 30 residuos aminoácidos. Las dos cadenas polipeptídicas están conectadas por dos enlaces disulfuro entre cadenas. Los enlaces disulfuro entre cadenas se producen entre los aminoácidos A7-B7 y A20-B19, respectivamente. Un tercer enlace disulfuro intra-cadena se encuentra en la cadena-A, entre los residuos de aminoácidos A6 y A11 (Figura 2).

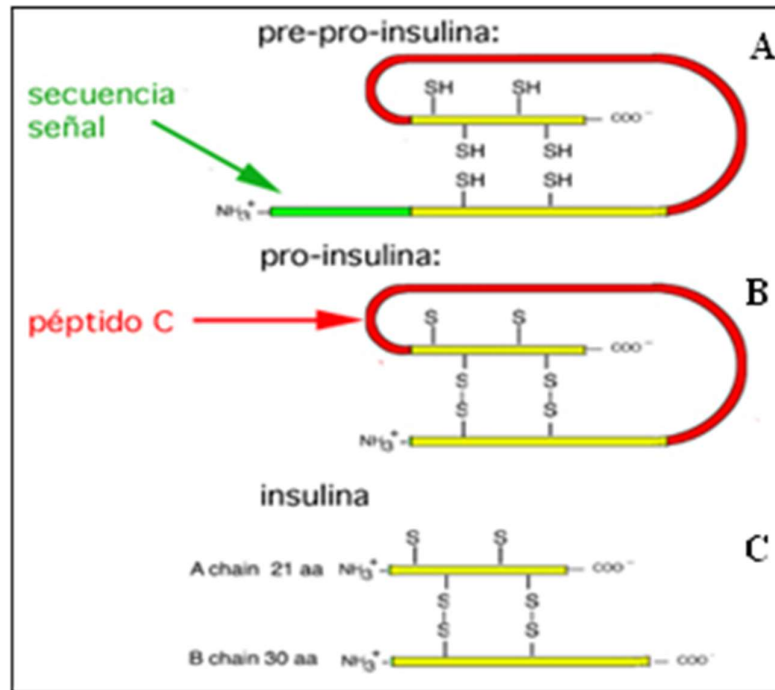
La estructura terciaria de la insulina está compuesta de dos regiones hélices alfa (A2-A8, A13-A19) unido por un lazo (A9-A11) entre los 21 residuos de la cadena-A y otra región hélice alfa en la cadena-B (Figura 3), y un núcleo hidrófobo de residuos no polares que son importantes para el plegamiento y manteniendo de la estructura (Vinther *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Estructuras terciarias de la insulina (código PDB 1MSO). La cadena A se muestra en azul y la cadena B en verde. Los tres enlaces disulfuro se muestran en amarillo.

En 1967 se descubrió que la insulina es sintetizada como pre-pro-insulina, la cual es procesada a insulina por una serie de procesos enzimáticos (Steiner y Oyer, 1967). La pre-pro-insulina consiste de un pre-péptido de 24 residuos de aminoácidos (secuencia líder, Figura 4) seguido de la proinsulina que contiene 86 residuos de aminoácidos en la siguiente configuración: pre-péptido-B-Arg-Arg-C-Lys-Arg-A, en el cual “C” es un péptido espaciador de 31 residuos de aminoácidos (Bell *et al.*, 1979), y “A” y “B” son las respectivas cadenas de la pro-insulina. La síntesis de la insulina pasa por una serie de etapas (Figura 4). Primero, la pre-pro-insulina es producida por los ribosomas en el retículo endoplasmático rugoso, que pasa a ser proinsulina cuando es removida la secuencia señal o líder (secuencia color verde, Figura 4A). Luego, la insulina se sintetiza a partir de la proinsulina (molécula precursora), por acción de enzimas proteolíticas conocidas como convertasas prohormonas, específicamente la convertasa pro-proteína 1 y la convertasa pro-proteína 2, así como la exoproteasa carboxipeptidasa (Steiner y Oyer, 1967).

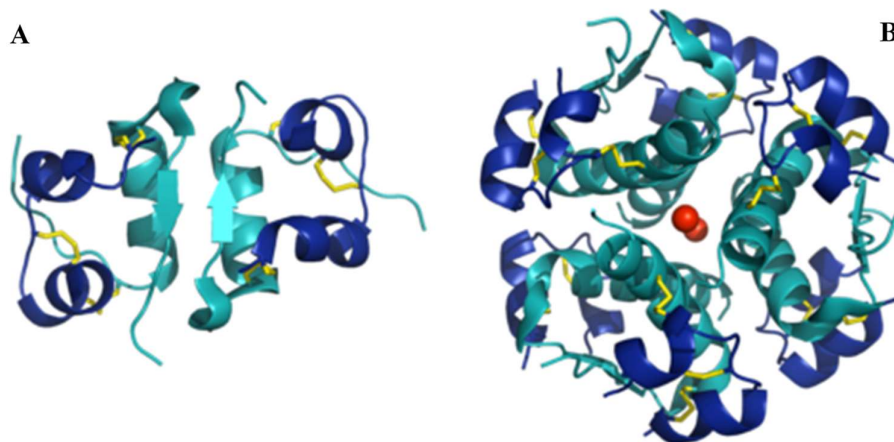
Posteriormente, la molécula es importada al aparato de Golgi, donde se modifica, eliminándose la región del péptido-C y se unen los dos fragmentos restantes mediante puentes disulfuro, quedando libres los extremos C-terminal y N-terminal de ambas cadenas A y B (Kjeldsen *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Proceso de transformación de la insulina. **A)** Pre-pro-insulina (Secuencia señal) en verde; región pro en rojo. **B)** Pro-insulina, consiste en los péptidos B, C y A. El plegamiento de las cadenas A y B, unidas por puentes sulfuros es espontánea. **C)** La cadena C es removida y el resto es la molécula madura insulina.

La carga neta de la insulina humana se produce a partir del potencial de ionización de cuatro residuos de ácido glutámico, cuatro residuos de tirosina, dos residuos de Histidina, un residuo de lisina y un residuo de arginina, junto con dos grupos  $\alpha$ -carboxilo y dos  $\alpha$ -amino. La insulina humana tiene un punto isoelectrico (pI) de 5.3 en estado desnaturalizado; por tanto, la molécula de insulina está cargada negativamente a pH neutro (Vinter *et al.*, 2015).

Otra propiedad intrínseca e importante de la molécula insulina es su capacidad para asociarse fácilmente en dímeros y hexámeros no covalentes (Figura 5). La fuerza impulsora de la dimerización parece ser la formación de interacciones hidrófobas favorables en el extremo C-terminal de la cadena-B (Kjeldsen y Pettersson, 2003). Este ensamble desempeña un papel importante en la biosíntesis, facilitando el transporte y la secreción en las células  $\beta$  del páncreas (Dodson y Steiner, 1998).



**Figura 5.** Estructuras terciarias del dímero y hexámero de la insulina. **A)** Monómero de insulina que se asocia en dímeros y se mantienen unidos por interacciones no covalentes. **B)** El hexámero de insulina (código PDB 1ZNI). Dos iones de zinc (esferas rojas) se coordinan con B10 His y con B5 His. La cadena A se muestra en azul y la cadena B en verde. Los tres enlaces disulfuro se muestran en amarillo.

### 2.3.2 Análogos de insulina (Glargina)

Los análogos de insulina humana son secuencias que difieren de la insulina en la secuencia de residuos de aminoácidos (Tabla 1 y Figura 2) (Beals *et al.*, 2019), pero son capaces de unirse a su receptor y actuar (Hirsch, 2005). Estos cambios aminoacídicos modifican su velocidad de absorción desde el tejido subcutáneo y le otorgan ventajas farmacológicas por asemejarse más a la secreción de insulina durante el período de ayuno (basal) y prandial (Standl, 2002). La incorporación a la práctica clínica de los análogos de insulina ha permitido mejorar de forma importante el control glucémico de los diabéticos (Beals *et al.*, 2019).

**Tabla 1.** Comparación de las modificaciones entre la insulina humana y sus análogos.

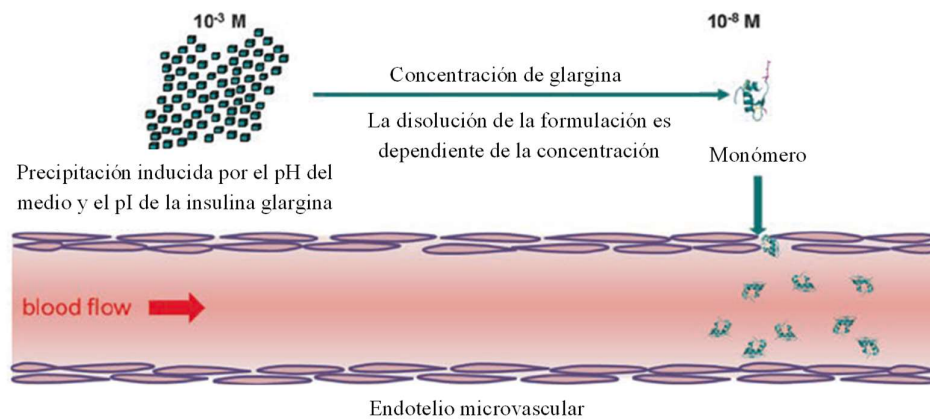
	Insulina humana	Modificación
Insulina lispro	Thr-Pro-Lys-Thr (B27-B28-B29-B30)	Thr- Lys-Pro-Thr (B27-B28-B29-B30) (ProB28Lys) y (LysB29Pro)
Insulina aspart	Thr-Pro-Lys-Thr (B27-B28-B29-B30)	Thr-Asp-Lys-Thr (B27-B28-B29-B30) (ProB28Asp)
glulisina	Thr-Pro-Lys-Thr (B27-B28-B29-B30)	Thr-Pro-Glu-Thr (B27-B28-B29-B30) (Lys29Glu)
	Val-Asn-Glu (B2-B3-B4)	Val-Lys-Glu (B2-B3-B4) (AsnB3Lys)
Insulina Glargina	Lys-Thr (B29-B30)	Lys-Thr-Arg-Arg (B29-B30-B31-B32)
	Cys-Gly (A20-A21)	Cys-Asp (GlyA21Asp)

Nota: A y B corresponde a las cadenas A y B de la insulina.

La insulina glargina es un análogo de insulina de acción prolongada con menos riesgo de hipoglucemia, fue el primer análogo basal desarrollado y a la venta en Estados Unidos y Europa desde el año 2000 (Danne *et al.*, 2003). Como la insulina humana, la glargina es una proteína globular compuesta de dos cadenas polipeptídicas (cadena-A y cadena-B) unidas por dos enlaces disulfuro. La glargina es el resultado de dos modificaciones estructurales: Primero, elongación de la cadena-B en su porción final con dos residuos de arginina (Figura 2, Tabla 1 y 2) La segunda modificación consistió en el reemplazo del aminoácido glicina en posición A21 por asparagina, confiriéndole mayor estabilidad química que la insulina humana y estabilización de los agregados moleculares (Gillies *et al.*, 2000; Hilgenfeld *et al.*, 2002).

La combinación de estos cambios estructurales provoca una modificación en el punto isoeléctrico de la proteína y la hacen soluble a pH ácido y, por ende, menos soluble a pH fisiológico (precipitación dependiente del pH). En otras palabras, estos cambios desplazan el punto isoeléctrico hacia la neutralidad y por tanto una micro-precipitación de la glargina en el sitio de inyección (Hilgenfeld *et al.*, 2002). Así, la insulina glargina es menos soluble a pH fisiológico y forma un micro-precipitado después de inyectarse en el tejido subcutáneo (Figura 6), lo que le

confiere un tiempo de liberación y absorción prolongado (Hilgenfeld *et al.*, 2002). A su vez, puede mejorar el control de los niveles de glucosa en sangre (post) prandial y basal (Nagel *et al.*, 2019). El inicio de acción de la glargina se produce a las 2-4 horas, manteniendo niveles estables por más de 24 horas (Figura 1). Este perfil farmacodinámico permite la administración en una sola inyección diaria. A pH 4.0, como en la solución inyectable de Galactus, la glargina es completamente soluble. Tras su inyección en el tejido subcutáneo, la solución ácida se neutraliza y se forman micro-precipitados de los que se liberan continuamente pequeñas cantidades de insulina glargina (Figura 6), lo que da origen a un perfil concentración/tiempo predecible, uniforme, sin picos y con duración prolongada de acción (Figura 1).



**Figura 6.** Representación esquemática de la disociación y absorción de la insulina glargina basal después de la administración subcutánea. pI: punto isoeléctrico. Figura tomada de Beals *et al.*, 2019.

## 2.4 Industria biotecnológica

En las últimas décadas, desde que los científicos aprendieron y lograron como manipular el ADN para identificar genes e integrarlos en organismos diferentes de la fuente original, se ha establecido y desarrollado la industria biotecnológica moderna. Esto ha permitido la producción comercial de enzimas industriales y proteínas biofarmacéuticas (Weinacker *et al.*, 2013). En el año 2012, el 25% de los productos farmacéuticos comerciales eran de origen biológico, de los cuales sus ventas excedieron los 100 billones de dólares (Martínez *et al.*, 2012). En el caso específico de México se realizó un trabajo de análisis del surgimiento y desarrollo del sector biotecnológico (Gómez y Rodríguez, 2008). Hay que destacar que muchos de los productos biotecnológicos que han sido introducidos comercialmente en el país son importados. Por tanto, el desarrollo de esta industria, en el futuro próximo, debería corresponder a las necesidades expresadas en otros sectores industriales y a la salud propiamente. En este sentido va enfocado el presente trabajo, la obtención de una insulina recombinante.

Un extracto de páncreas canino fue empleado por primera vez para el tratamiento de la diabetes, lográndose disminuir los niveles de azúcar a niveles casi normales (Best, 1956). Desde la década de 1920 fue posible el tratamiento los pacientes diabéticos con insulina y durante décadas esta molécula fue purificada de páncreas del ganado vacuno y porcino.

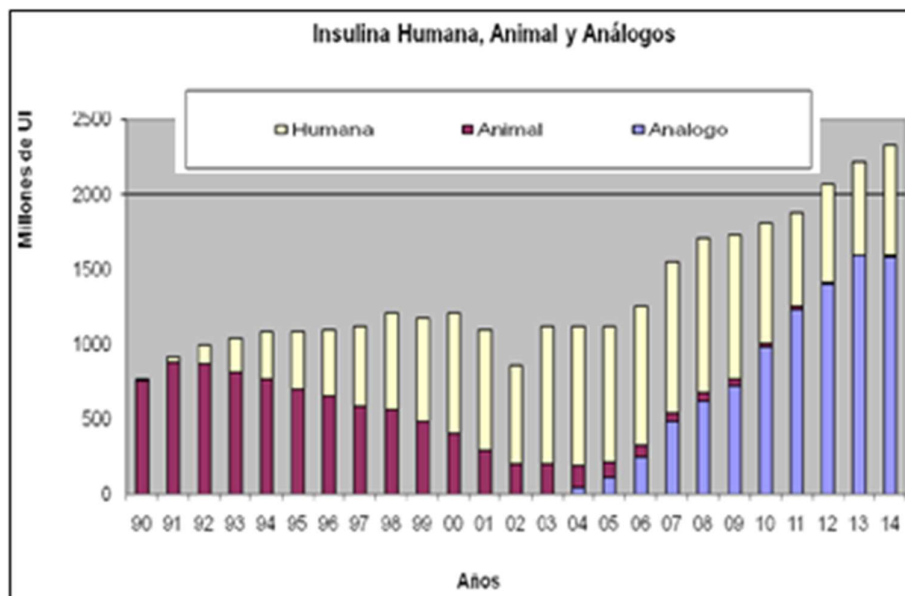
Aproximadamente 150 mg de insulina es posible purificar a partir de un páncreas bovino (Kjeldsen, 2000). El promedio de la dosis de insulina diariamente para el tratamiento de un adulto con diabetes es aproximadamente entre 40-60 unidades internacionales (UI), equivalente a 1.4-2.1 mg de insulina. Para el año 2000, se estimó que en el mundo industrializado más de 130 mil millones de UI, aproximadamente 4600 kg de insulina son usadas anualmente para el tratamiento de pacientes que requieran insulina (Kjeldsen, 2000).

Desde hace más de dos décadas se sabe que, para satisfacer las cantidades necesarias del mercado de insulina fue casi imposible de alcanzar a partir de la tecnología de la extracción pancreática bovino o porcino (Kjeldsen, 2000). Máxime, si las cantidades de pacientes diabéticos mantienen un ritmo de crecimiento superior al 3% (Cho *et al.*, 2018). En la actualidad se estiman más de 100 millones de personas que necesitan insulina (Wirtz *et al.*, 2016).



El desarrollo de la biología molecular y la biotecnología moderna permitieron nuevas oportunidades para la producción de moléculas, específicamente insulina humana y sus análogos, a partir de la obtención del primer plásmido sintético utilizado para la expresión de genes heterólogos en células de *E. coli* (Bolivar *et al.*, 2017).

En la Figura 7 se muestra el crecimiento de la producción de análogos de insulinas, muy superior a la producción de insulina humana y casi despreciable la obtención de insulina a partir de una fuente animal.



**Figura 7.** Representación gráfica de la disponibilidad de diferentes tipos de insulinas (humana, animal y análogos) en las dos últimas décadas. Tomado de <http://www.imshealth.com/>, acceso en julio 2016.

El alcanzar una producción competitiva de proteínas recombinantes no es sencillo, pues los procesos industriales deben producir la mayor cantidad de producto en el menor tiempo posible y a bajo costo, por lo que generalmente, el desarrollo de un nuevo proceso o producto requiere de la elección de un hospedero adecuado para la producción de la molécula de interés (Mattanovich *et al.*, 2012; Porro *et al.*, 2005).

La industria biotecnológica ha empleado numerosos microorganismos, bacterianos (Baeshen *et al.*, 2015) y eucarióticos (Cregg JM *et al.*, 2000; Mattanovich *et al.*, 2012; Serrano-Rivero *et al.*, 2016), como plataformas de producción de biomoléculas. La tecnología de ADN recombinante se ha utilizado para la producción de insulinas y *Escherichia coli* (*E. coli*) se puede utilizar para este propósito, ya que es un huésped sencillo y rentable. Sin embargo, el sistema de expresión de *E. coli* tiene limitaciones; por ejemplo, la formación de cuerpos de inclusión intracelulares y, en consecuencia, la obtención de proteínas heterólogas mal plegadas. Por tanto, en un

proceso posterior, es necesario realizar pasos de desnaturalización y renaturalización. Por el contrario, la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) puede crecer tanto en medios definidos como complejos y secretar en altos niveles el producto recombinante correctamente plegado, incluso con formación de enlaces disulfuro y con bajos niveles de proteínas endógenas secretadas (Potvin *et al.*, 2012). Por otro lado, el sistema de expresión en *P. pastoris* tiene la ventaja de que es un organismo GRAS (“Generally recognize as safe”), generalmente reconocido como seguro. Su genoma se encuentra secuenciado, realizan modificaciones postraduccionales y producen grandes cantidades de proteínas heterólogas en poco tiempo (Kim *et al.*, 2012; Ahmad *et al.*, 2014).

## **2.5 *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) como organismo modelo para la producción de proteínas recombinantes**

### **2.5.1 Importancia**

*Pichia pastoris* (actualmente reclasificada como *Komagataella pastoris*) es una levadura metilotrófica conocida como una de las grandes máquinas de expresión de proteínas recombinantes en los trabajos de biotecnología. Este sistema de expresión de proteínas es ampliamente utilizado y bien establecido para la producción de enzimas biofarmacéuticas e industriales (Safder *et al.*, 2018) y es considerado como un microorganismo generalmente seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) (Love *et al.*, 2018). Este microorganismo es capaz de producir alrededor de 500 proteínas heterólogas con altos niveles de las 1750 conocidas hasta el momento (Potvin *et al.*, 2012). Este microorganismo fue introducido por primera vez por “Phillips Petroleum” como recurso alimentario para animales, para lo cual se desarrolló un proceso de fermentación de alta densidad celular que emplea metanol como única fuente de carbono. Esta levadura no fermentativa puede manipularse fácilmente para secretar con éxito numerosas proteínas heterólogas, mientras que secreta pequeñas cantidades de proteínas endógenas (Cregg *et al.*, 2000).

El sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en la levadura *P. pastoris* es uno de los más populares debido a: 1) Es de fácil manipulación y con alta estabilidad génica, 2) tiene una tasa de crecimiento rápido en medios simples, 3) produce y secreta altos niveles de proteínas heterólogas, 4) secreta bajas cantidades de proteína endógena, 5) presenta alta capacidad de realizar modificaciones postraduccionales que consiste en glicosilación, plegamiento, enlace disulfuro, proceso proteolítico, 6) posee promotores fuertes y regulados, 8) su preferencia por el

crecimiento aerobio sobre el fermentativo y 9) prevención de la contaminación por toxinas virales o bacterianas (Keikha, 2019).

### **2.5.2 Promotores de la enzima alcohol oxidasas**

La capacidad de la levadura *P. pastoris* para consumir metanol como única fuente de carbono está dada por la presencia intracelular de dos enzimas, alcohol oxidasa, (AOX1 y AOX2) (Cregg *et al.*, 1989). La enzima alcohol oxidasa es la primera enzima en la vía de utilización del metanol (actividad oxidante del metanol) con dos variantes codificadas por los genes, *AOX1* y *AOX2*. Las regiones codificantes de estos dos genes presentan una similitud en su secuencia nucleotídica del 90%, sin embargo, varían en las regiones promotoras (Cregg *et al.*, 1989). Las enzimas AOX1 y AOX2 se sintetizan en grandes cantidades dentro de la célula, llegando a ser hasta un 30% de las proteínas intracelulares solubles, cuando *P. pastoris* se cultiva en presencia de metanol como única fuente de carbono en el medio de cultivo (Cereghino y Cregg, 2000; Li *et al.*, 2007). Durante el estado de inducción por la presencia de metanol en el medio de cultivo, la enzima AOX1 es responsable de la mayoría de la actividad enzimática del alcohol oxidasa (Cregg *et al.*, 2000), siendo su promotor, más importante para la expresión del alcohol oxidasa. Así, *P. pastoris* tiene un promotor fuerte, que es estrictamente regulado derivado del gen *AOX1*, que se induce con metanol, lo que lo hace apropiado para el control de la expresión de genes heterólogos (Cregg *et al.*, 2000).

Al ser el promotor del gen *AOX1* un promotor fuerte y regulable, se ha utilizado en la construcción de vectores sintéticos (Ahmad *et al.*, 2014), utilizados para la expresión y producción de una gran variedad de proteínas heterólogas (Looser *et al.*, 2015). Por el contrario, el promotor del gen *AOX2* conduce a una menor expresión de la enzima alcohol oxidasa en la célula, sin embargo, su funcionalidad puede indicar una ventaja competitiva en ciertas circunstancias (Cregg *et al.*, 1989).

### **2.5.3 Fenotipos de utilización de metanol (Mut)**

Las cepas de *P. pastoris* se pueden clasificar en tres fenotipos, basados en la capacidad de utilizar metanol como fuente de carbono y energía (Mut): 1) Las cepas Mut<sup>+</sup>, utilización de metanol “plus” o crecimiento en metanol tipo nativa, portan los genes *AOX1* y *AOX2* intactos y funcionales, o sea que crecen a partir de una fuente de metanol igual que el tipo salvaje. 2) Las cepas Mut<sup>s</sup>, utilización lenta de metanol, tienen la pérdida de la funcionalidad del gen *AOX1* y, por tanto, la pérdida de la mayor parte de la actividad de la enzima alcohol oxidasa de la célula. En este caso las células

sólo tienen el gen *AOX2* intacto y funcional. Esto da como resultado una reducción en la capacidad de las células para metabolizar el metanol. Por tanto, las células exhiben un crecimiento lento en medio con metanol. 3) Las cepas *Mut<sup>-</sup>*, utilización nula del metanol, en las cuales el gen *AOX1* como el gen *AOX2* se encuentran inactivados y por lo tanto no pueden utilizar el metanol como fuente de carbono y energía, o sea no puede metabolizar el metanol (Cregg *et al.*, 1989; Li *et al.*, 20007). Recientemente se ha reportado una imagen más clara de los beneficios y desventajas del fenotipo de *P. pastoris Mut<sup>-</sup>*, y se demostró el alto potencial en una variedad de aplicaciones (Zavec *et al.*, 2020).

Los fenotipos *Mut<sup>+</sup>* y *Mut<sup>s</sup>* se utilizan al evaluar transformantes de *P. pastoris* para la integración del casete de expresión. Estos tres fenotipos se encuentran disponibles comercialmente y se derivan todos de la misma cepa original, aunque tienen una velocidad específica de crecimiento diferente en presencia de metanol: *Mut<sup>+</sup>* (0.14 h<sup>-1</sup>), *Mut<sup>s</sup>* 0.04 h<sup>-1</sup> y *Mut<sup>-</sup>* (0.0 h<sup>-1</sup>) (Stratton *et al.*, 1998; Looser *et al.*, 2015).

## **2.6 Sistema de expresión de *Pichia pastoris***

### **2.6.1 Cepas**

El sistema de expresión de genes heterólogos en *P. pastoris* está basado en vectores y cepas modificadas que son capaces de transformarse integrando el vector en su genoma de manera sitio-dirigida (Cereghino y Cregg, 2000). Todas las cepas de *P. pastoris* que son empleadas como sistemas de expresión, son derivadas de la cepa NRRL-Y 11430 y de la X-33. Muchas de estas cepas tienen una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) que permite la selección por auxotrofia a Histidina de las clonas que adquirieron el gen *HIS4* funcional después de la transformación (Cregg *et al.*, 1985). Para evitar la proteólisis de las proteínas heterólogas en los sistemas de producción de *P. pastoris*, se han desarrollado cepas modificadas como la SMD1165 (*Δhis4 Δprb1*) y SMD1168 (*Δhis4 Δpep4*) para ser deficientes en proteasas (Higgins y Cregg, 1998). Se han descrito las cepas más empleadas, así como sus características principales, para la producción de proteínas heterólogas en el sistema de expresión de *P. pastoris* (Ahmad *et al.*, 2014). En la Tabla 2 se muestra un resumen.

**Tabla 2.** Cepas de *P. pastoris* utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes.

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Características
<u>Cepas tipo salvaje (“wild-type”)</u>			
CBS7435 (NRRL Y- 11430)	WT	WT	Cepa Nativa.
X-33	WT	WT	Selección de vectores de expresión resistentes a Zeocina.
<u>Cepas con deficiencia de Histidina deshidrogenasa</u>			
GS115	<i>his4</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup>	Consumo de metanol alto, auxótrofa a Histidina. Uso de vectores de expresión que contienen <i>HIS4</i> .
<i>Pichia</i> Pink™ KM71	<i>ade2 his4, aox1::ARG4, arg4</i>	Ade <sup>-</sup> His <sup>-</sup> , Mut <sup>s</sup>	Consumo de metanol bajo, auxótrofa a Histidina. Uso de vectores de expresión que contienen <i>HIS4</i> . Fenotipo Mut <sup>s</sup> .
KM71H	<i>aox1::ARG4, arg4</i>	Mut <sup>s</sup>	Consumo de metanol bajo, auxótrofa a Histidina. Uso de vectores de expresión que generan resistencias a Zeocina. Fenotipo Mut <sup>s</sup> .
<u>Cepas con deficiencia de actividad proteasa</u>			
SMD1165	<i>his4 prb1</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup>	Consumo de metanol alto, auxótrofa a Histidina, no produce la proteinasa B.
SMD1168	<i>his4 pep4::URA3 ur</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup>	Consumo de metanol alto, auxótrofa a Histidina, no produce la Proteinasa A. Uso de vectores de expresión que contienen <i>HIS4</i> . Cepas sin actividad de proteasa A.
SMD1168H	<i>pep4</i>		Uso de vectores de expresión que genera resistencias a Zeocin. Cepas sin actividad de proteasa A.

WT: Cepas tipo salvaje (“wild-type”)

## 2.6.2 Vectores

Los vectores de expresión diseñados para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* son vectores de lanzadera (*E. coli*/*P. pastoris*), pues la clonación del gen heterólogo generalmente se lleva a cabo en *E. coli*. Estos vectores comparten características tales como: contienen un origen de replicación para la replicación del plásmido en *E. coli*, una secuencia promotora para la expresión, un terminador transcripcional que dirige el procesamiento y la poliadenilación de los ARNm, un sitio de clonación múltiple (SMC) para la inserción de una secuencia codificante del producto de interés, flanqueada por secuencias promotoras y de terminación derivadas de gen *AOX1*. Además, algunos de estos vectores incluyen el gen *HIS4* de *P. pastoris* como marcador de selección por auxotrofia a Histidina o incluyen genes de resistencia a antibióticos como Kanamicina o Zeocina (Higgins y Cregg, 1998).

Para la secreción de las proteínas heterólogas, algunos de los vectores de expresión incluyen secuencias diseñadas para la secreción de dichas proteínas heterólogas, como por ejemplo secuencia codificante para la señal de secreción compuesta por el péptido pre-pro del factor  $\alpha$  ( $\alpha$ -MF) de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Li *et al.*, 2007). El promotor más usado en los vectores de expresión es el del gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (*AOX1*) ya que es un promotor fuerte y bien regulado, que es reprimido en presencia de glicerol e inducido por metanol (Çalik, *et al.*, 2015). Se han descrito detalladamente los vectores más empleados para la producción de proteínas heterólogas en el sistema de expresión de *P. pastoris* (Ahmad *et al.*, 2014; Karbalaei *et al.*, 2020). En la Tabla 3 se muestra un resumen de los vectores de expresión más empleados, además, es de mencionar que los niveles más altos expresión de proteínas heterólogas reportados en *P. pastoris* se han logrado con el promotor *AOX1* (hasta 22 g/L y 15 g/L, intracelular y secretada, respectivamente) (Werten *et al.*, 2013).

**Tabla 3.** Vectores de expresión empleados para la producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*.

Vectores de expresión	Marcador de selección	Características
pPIC3K	<i>HIS4</i> y <i>kan<sup>r</sup></i>	Sitio múltiple de clonación; selección de cepas multicopias con G418.
pPICZ	<i>ble<sup>r</sup></i>	Sitio múltiple de clonación; selección de cepas multicopias con Zeocina; fusión de la proteína heteróloga con etiqueta de seis aa histidinas.
pGAPZ	<i>ble<sup>r</sup></i>	Promotor <i>GAP</i> , sitio múltiple de clonación, selección con Zeocina, fusión de la proteína heteróloga con etiqueta de seis aa histidinas.
pPIC9	<i>HIS4</i>	Promotor <i>AOX1</i> acoplado a factor de secreción $\alpha$ -MF, sitios XhoI, EcoRI, NotI, SnaBI y AvrII para inserción.
pPICZ $\alpha$	<i>ble<sup>r</sup></i>	Promotor <i>AOX1</i> acoplado a factor de secreción $\alpha$ -MF, sitio múltiple de restricción, generación de multicopias, selección con Zeocina, fusión de la proteína heteróloga a una cola de seis aa histidinas.
pGAPZ $\alpha$	<i>ble<sup>r</sup></i>	Promotor <i>GAP</i> acoplado a factor de secreción $\alpha$ -MF, sitio múltiple de restricción, selección con Zeocina, fusión de la proteína heteróloga a una cola de seis aa histidinas.

aa: Aminoácidos

## 2.7 Bioprocesos con *Pichia pastoris*

La ventaja de usar *P. pastoris* como hospedero en un sistema de expresión que combina la capacidad de producir de manera eficiente proteínas heterólogas, crecer en un medio mínimo a alta densidad celular y presentar bajos niveles de secreción de proteínas endógenas (Liu *et al.*, 2019). En el escalamiento de un bioproceso, de matraz agitado a biorreactor, se incrementa la producción volumétrica de la proteína heteróloga de 10 a 100 veces (Li *et al.*, 2017) debido a que los parámetros del cultivo como, por ejemplo, la temperatura, aeración, pH y la alimentación de la fuente de carbono son controlados en línea (Figura 8A). Un sistema de fermentación controlado automáticamente generalmente consta de un vaso, sistema de monitoreo y controladores de temperatura y oxígeno disuelto, sistema de suplementación de la fuente de carbono, analizador de gases de salida y otros componentes según sea necesario (Liu *et al.*, 2019).

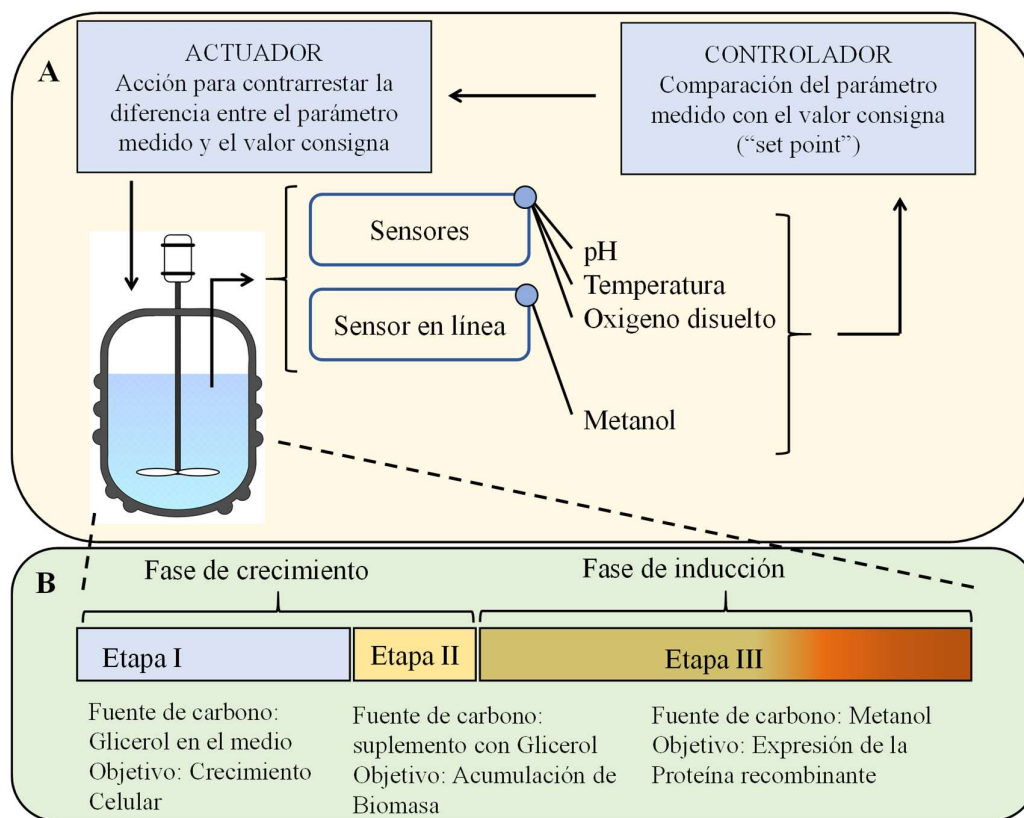
El control de los parámetros del cultivo que definen las condiciones de cultivo en los bioprocesos con *P. pastoris* es clave para lograr altas producciones volumétricas de proteínas heterólogas. Invitrogen, proporciona un manual completo para llevar a cabo estos bioprocesos

([http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect\\_man.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf), acceso en febrero de 2021); en el cual se detallan estrategias para el control del bioproceso; dependiendo del fenotipo de utilización de metanol de las células huésped empleadas. Se recomienda que los parámetros clave para el control del bioproceso sean, por ejemplo, la temperatura, el pH, oxígeno disuelto, la agitación y, a ser posible, la adición de la fuente de carbono. El control de los parámetros de un cultivo se puede llevar a cabo de tres formas: “*in situ*” (“in-line”), en línea (“on-line”) y en discontinuo (“off-line”). Se considera un parámetro controlado “*in situ*” como aquel que es detectado mediante una sonda que se encuentra sumergida en el medio de cultivo y tiene un tiempo de respuesta rápido para proporcionar la medición. Este tipo de mediciones es muy útil para usar una estrategia de control por retroalimentación (“feed-back control”), en la cual un sistema automatizado de control (controlador) toma decisiones en base a comparar el valor medido por la sonda con un valor deseado o de consigna (“set-point”). Ejemplo de estas mediciones son la determinación del pH, temperatura y concentración del oxígeno disuelto en el medio de cultivo y la supresión de parámetros de parámetros que van de detrimento del proceso, tales como exceso de espuma y altas presiones. Un parámetro controlado en línea es aquel que se realiza con una sonda fuera del medio de cultivo, pero al lado o cerca del biorreactor. También tiene un tiempo de respuesta rápido, por lo que también es útil para usar una estrategia de control por retroalimentación. Ejemplos de estas mediciones son, la determinación de la densidad óptica o densidad celular mediante un espectrofotómetro con una celda de flujo conectada a una salida del vaso del reactor. Por último, un análisis en discontinuo es aquel que se lleva a cabo para determinar parámetros que no son vitales para el control del proceso y tarda en proporcionar la información, pero estos parámetros resultan informativos para la evaluación para la evaluación posterior del bioproceso. Estas determinaciones no permiten modificar el proceso sobre la marcha, pero otorgan un panorama general para las modificaciones que se deben hacer en el siguiente bioproceso. Parámetros tales como la densidad celular mediante la determinación de la concentración del peso de las células secas, la producción de la proteína heteróloga, la actividad de proteasas, consumo total de nutrientes, etc., son mediciones en discontinuo.

Típicamente, un bioproceso en biorreactor con *P. pastoris* en el que la producción de la proteína heteróloga está controlada por el promotor *AOX1* se divide en una fase de crecimiento y otra de inducción. La fase de crecimiento a su vez se



compone de dos etapas: una etapa de lote (“batch”) con glicerol como fuente de carbono, seguida de una etapa de lote alimentado con glicerol (“fed-batch”). Posteriormente se realiza la fase de inducción mediante un lote alimentado con metanol (Figura 8B). Durante la etapa de lote de glicerol se permite a las células crecer a una velocidad específica de crecimiento máxima, no estando restringida la fuente de carbono. En la etapa de lote alimentado con glicerol, el cultivo se mantiene limitado con la fuente de carbono y las células crecen a una velocidad específica de crecimiento controlada. Esto se realiza con el objetivo de obtener la densidad celular deseada antes de iniciar la siguiente fase de inducción, durante la cual se produce y secreta al medio de cultivo la proteína heteróloga (Cereghino y Cregg, 2000; Stratton *et al.*, 1998). En la etapa de lote alimentado con glicerol, además de alimentar a una velocidad que limita el crecimiento, se des-reprime el promotor *AOXI* en preparación para la inducción (Liu *et al.*, 2019). Para un mejor control de la fase de inducción, se monitorea la concentración de metanol en el medio de cultivo mediante un sensor en línea que analiza los gases de salida del biorreactor.



**Figura 8.** Esquema de un bioproceso automatizado con *Pichia pastoris* a alta densidad celular. **A)** Sistema de control automático. El sistema tiene conectado varias sondas “*in situ*” y una en línea (sonda de metanol) que recopilan información de los parámetros a controlar, los cuales son comparados con valores de consigna (set-point) por el Controlador, quien proporciona una señal al Actuador con el fin de realizar una acción que corrija los parámetros evaluados por los sensores. **B)** Dos fases típicas de un bioproceso con *P. pastoris* en el que la producción de la proteína heteróloga está controlada por el promotor *AOX1*: crecimiento e inducción. La fase de crecimiento se suele realizar en dos etapas: lote en glicerol (Etapa I) y lote alimentado con glicerol (Etapa II). La fase de inducción se suele realizar en una etapa de lote alimentado con metanol (Etapa III).

Recientemente, se han realizado muchos esfuerzos para aumentar la producción de proteínas heterólogas utilizando el sistema de expresión de *P. pastoris* (Zahrl *et al.*, 2017; Yang y Zhang, 2017; Juturu y Wu, 2018), que incluyen ingeniería de las cepas (Ahmad *et al.*, 2014), diseño de nuevos vectores (Vogl *et al.*, 2018), promotores alternativos (Potvin *et al.*, 2012), optimización de procesos (Braga *et al.*, 2018), estudios de cinética de formación de productos (Looser *et al.*, 2015) y modificaciones postraduccionales (Bracke *et al.*, 2018). Sin embargo, todavía existe el interés de aumentar los niveles de producción volumétrica de la proteína heteróloga en *P. pastoris* y establecer procesos robustos en cultivos de alta densidad celular.

En el caso que la producción de la proteína heteróloga que esté controlada por el promotor *AOX1*, la etapa de inducción con metanol (Etapa III, Figura 8B) es la más importante para el diseño del cultivo.

El metanol es el inductor del gen heterólogo y sería razonable desear una alta concentración de metanol en el medio de cultivo. Sin embargo, dado que las altas concentraciones de metanol son tóxicas para las células de levadura, entonces la adición de metanol debe evaluarse cuidadosamente para alcanzar un equilibrio entre la producción de la proteína recombinante y la toxicidad de los subproductos del metabolismo del metanol. Recientemente se han descrito concentraciones óptimas de metanol para la producción de proteínas recombinantes (Karbalaei *et al.*, 2020). En general, para controlar el consumo de metanol de *P. pastoris* se implementan estrategias de alimentación con metanol; adecuando su adición a la respuesta fisiológica del hospedero (Cos *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2020). Debido al metabolismo del metanol, se generan subproductos tóxicos como el formaldehído, el formiato y el peróxido de hidrógeno, los cuales se acumulan dentro de la célula en los peroxisomas (Cregg *et al.*, 2018). Cuando una célula muere, se produce lisis celular y se generan productos tóxicos que se liberan al medio de cultivo, acumulándose y causando toxicidad a las células del cultivo (Cregg *et al.*, 2000). Por tanto, la estrategia de alimentación con metanol en la etapa de inducción-producción es crucial para aumentar los niveles de producción de proteínas recombinantes (Looser *et al.*, 2015).

El alto nivel de producción de una proteína específica en *P. pastoris* todavía está, al menos en parte, limitado por el control del proceso de alimentación con metanol (Liu *et al.*, 2019). Se utilizan comúnmente dos estrategias de alimentación de metanol: lote de alimentación limitado de metanol (MLFB) y lote de alimentación no limitado de metanol (MNLFB) (Barrigón *et al.*, 2013). En la estrategia MLFB, la velocidad de alimentación de metanol se ajusta para mantener una velocidad específica de crecimiento constante ( $\mu$ ), mientras que en la estrategia MNLFB, la concentración de metanol en el medio de cultivo se mantiene constante mediante un sistema automático de retroalimentación, y así controlar la concentración de metanol al nivel deseado.

## **2.8 Condiciones de cultivo en los bioprocesos con *Pichia pastoris***

Con respecto al bioproceso, el uso de una estrategia adecuada durante el cultivo en biorreactor con *P. pastoris* puede determinar la diferencia entre niveles altos o bajos de producción y rendimientos de la proteína heteróloga. Existen diversos factores ambientales que afectan tanto al metabolismo de la levadura como en la producción

de proteínas heterólogas (Li *et al.*, 2007). Estos factores pueden clasificarse en tres tipos por su origen: químicos (composición y pH del medio de cultivo); físicos (velocidad de agitación, oxígeno disuelto, temperatura en el medio de cultivo) y factores inherentes al microorganismo (tipo de cepa, biomasa inicial al momento de la inducción y capacidad de secreción de la proteína recombinante). Hay que señalar que, existen protocolos generales para el cultivo de *P. pastoris* (<http://thermofisher.com/>), pero muchos estudios indican que la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* debe optimizarse de acuerdo con cada proceso de forma individual siguiendo principios establecidos.

A continuación, se relacionan algunos factores para tener en cuenta a la hora de optimizar un cultivo con *P. pastoris*.

### **2.8.1 El valor de pH**

La optimización del pH es fundamental para el crecimiento celular, la formación y estabilidad de las proteínas recombinantes. *P. pastoris* tolera un rango relativamente amplio de pH, 3.0-7.0, y el valor óptimo para el crecimiento está entre 3.5-5.5 (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Muchos trabajos han referido la importancia de evaluar este parámetro para optimizar la producción de la proteína recombinante (Li *et al.*, 2007). Para optimizar este parámetro se debe tener en cuenta no solo la tolerancia de la levadura a un determinado pH, sino también las propiedades de las proteínas individuales, especialmente la estabilidad molecular de la proteína recombinante (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Realmente, el pH óptimo se determina mejor realizando una serie de cultivos a diferentes valores de pH (Li *et al.*, 2007).

### **2.8.2 Aireación y oxígeno disuelto**

*P. pastoris* es un microorganismo aerobio estricto que necesita altas cantidades de oxígeno cuando se crece en presencia de metanol como única fuente de carbono, y algo menor en cultivos con glicerol o glucosa. El oxígeno afecta la formación de productos durante un cultivo aeróbico al influir en las vías metabólicas y cambiar los flujos metabólicos (Çalık *et al.*, 2000). El oxígeno molecular no solo se usa para la respiración en el organelo de la mitocondria, sino también para la oxidación inicial del metanol por la enzima alcohol oxidasa (AOX). Esta reacción genera dos subproductos tóxicos, el formaldehído y el peróxido de hidrógeno (Juturu y Wu, 2018; Liu *et al.*, 2019). En los bioprocesos con *P. pastoris* el oxígeno disuelto generalmente se mantiene en valores por encima de 20-30% durante toda la fase de inducción en metanol (Jahic *et al.*, 2006; Sreekrishna, 2010; Li *et al.*, 2007), esto se debe a que

*P. pastoris* es deficiente en las rutas de fermentación, por lo que el oxígeno debe estar siempre presente para evitar estrés y muerte celular (Cereghino y Cregg, 2000).

### **2.8.3 Temperatura**

Muchos procesos celulares importantes como el metabolismo del carbono central, la respuesta al estrés y el plegamiento de proteínas, se ven afectados al cambiar la temperatura de crecimiento de *P. pastoris* (Dragosits *et al.*, 20009). Cuando se estudia un bioproceso para la producción de proteínas recombinantes se debe tener en cuenta que, la temperatura óptima de crecimiento celular no siempre es equivalente a la temperatura óptima de producción de la proteína heteróloga (Bayraktar, 20009). Además, las proteínas sobre producidas en el retículo endoplásmico pueden plegarse incorrectamente a alta temperatura generando degradación del producto recombinante y estrés del organismo hospedero por la sobrecarga metabólica, por lo que optimizar una temperatura puede incrementar significativamente la producción (Li *et al.*, 2007) y además reducir el estrés y la formación de sub-productos tóxicos debido a éste (Sreekrishna y Kropp, 2010).

La temperatura estándar para un cultivo de *P. pastoris* indicada por el manual de la compañía Life Technologies, Invitrogen (<http://thermofisher.com/>) es de 30°C. Sin embargo, una temperatura de inducción por debajo de 30°C juega un papel importante en la mejora de la producción de proteína recombinante extracelular en *P. pastoris*, debido a la disminución de la proteólisis y el estrés por plegamiento, y al aumento de la viabilidad celular (Jahic *et al.*, 2003; Dragosits *et al.*, 2009).

### **2.8.4 Concentración de metanol en el medio de cultivo**

La concentración de metanol es uno de los parámetros más importantes para optimizar un bioproceso en el sistema de expresión de *P. pastoris*. La concentración de metanol debe mantenerse a niveles limitantes. Niveles altos de este sustrato pueden ser tóxicos para las células y los niveles bajos pueden no ser suficientes para proporcionar fuente de carbono y energía e iniciar la transcripción del gen heterólogo regulado por el promotor de la enzima alcohol oxidasa. Muchos trabajos han reportado concentraciones diferentes de metanol para la producción de una proteína recombinante específica (Karbalaei *et al.*, 2020).

Para administrar el metanol en un bioproceso con *P. pastoris* se utilizan dos tipos de estrategias (Barrigón *et al.*, 2013). La primera consiste en mantener la velocidad específica de crecimiento constante, mediante la adición de metanol a una velocidad que sigue un perfil exponencial y se corresponde con la estrategia de MLFB. En la

segunda estrategia, MNLFB, se mantiene la concentración de metanol constante en el medio de cultivo a lo largo de todo el tiempo de cultivo en la fase de inducción (Viader-Salvadó *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019).

Estas dos estrategias provocan un comportamiento metabólico distinto en la levadura. Cuando se busca mantener la velocidad específica de crecimiento constante, generalmente se administra metanol en exceso en la parte final de la etapa de inducción, lo que a su vez produce compuestos tóxicos como el formaldehído y peróxido de hidrógeno. Por otro lado, mantener la concentración de metanol constante puede provocar limitación de la fuente de carbono y energía para la levadura acelerando el estrés metabólico y produciendo muerte y lisis celular.

La estrategia de alimentación de metanol en la etapa de inducción-producción es crucial dentro de la optimización de cultivos de *P. pastoris* para aumentar los niveles de producción de la proteína recombinante (Cos *et al.*, 2006; Looser *et al.*, 2015).

#### **2.8.5 Densidad celular al inicio de la inducción**

El concepto principal de la estrategia de la concentración de biomasa (densidad celular) inicial es que se define la concentración de biomasa inicial requerida antes de la etapa de inducción y se cuantifica inmediatamente la relación entre la biomasa y la velocidad de alimentación de metanol, que se ajusta para maximizar la producción de la proteína heteróloga proporcionando datos para el proceso de escalamiento (Liu *et al.*, 2019). Por otro lado, se cree que a mayor concentración de biomasa al inicio de la inducción, se tienen mayores rendimientos en la producción de proteínas heterólogas. Por tanto, producir una alta densidad celular durante la etapa II de lote alimentado con glicerol (Figura 8B) es crucial para obtener altos rendimientos durante la fase de inducción (Sreekrishna, 2010). Algunos reportes muestran la influencia de la optimización de este parámetro en la producción de proteínas heterólogas (Liu *et al.*, 2019).

#### **2.8.6 Velocidad específica de crecimiento y cinética de producción**

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) es un factor indicativo de la fisiología celular y puede ser afectado por la producción de proteínas recombinantes o simplemente la modificación genética con el gen heterólogo. La cinética de producción se relaciona con la velocidad de formación de producto específica ( $q_p$ : en unidades de medida de mg de producto por gramos de peso seco celular por hora) y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ : en unidades de medida de  $h^{-1}$ ) y refleja el equilibrio entre varios procesos en una célula hasta que el producto es secretado (es decir, inducción y transcripción del

gen heterólogo, traducción, plegamiento y tráfico de la proteína recombinante a través de la vía secretora). El conocimiento de la relación entre  $q_p$  y  $\mu$  es esencial para maximizar  $q_p$  (Potgieter *et al.*, 2010; Hang *et al.*, 2008). Por lo tanto, una determinación cuidadosa de  $\mu$  es esencial para el diseño de la estrategia de producción en las que el crecimiento se mantiene en un cierto valor  $\mu$  óptimo mediante la adición controlada del sustrato de la fuente carbono en el modo de lote de alimentación (Looser *et al.*, 2015).

### **2.8.7 Efectos multifactoriales de las condiciones de cultivo**

En resumen, a pesar del conocimiento que se tiene de la influencia de las condiciones de cultivo y el impacto en el nivel de expresión del gen heterólogo en *P. pastoris*, aún están pobremente caracterizadas y más sabiendo que están relacionadas con la cepa específica construida (Mattanovich *et al.*, 2004).

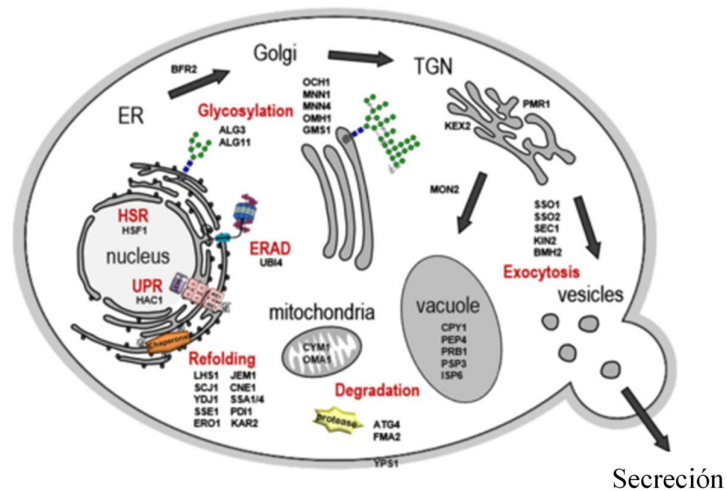
Claramente algunos factores influyen a otros y varios de ellos podrían influir sobre el mismo parámetro fisiológico. La concentración de metanol, fuentes de carbono adicionales y la temperatura tienen influencia en el crecimiento celular, a su vez el crecimiento celular influye en la demanda de metanol, que, a su vez, junto con la temperatura y fuentes de carbono adicionales influyen en el estrés metabólico. La temperatura influye sobre la secreción de proteínas y junto con el pH influyen en la estabilidad de las proteínas, lo que al final afecta la producción del proceso global.

## **2.9 Secreción de proteínas en *Pichia pastoris***

La secreción de las proteínas heterólogas hacia el medio de cultivo requiere de varios pasos para la conversión de secuencias de ADN codificante a proteínas maduras, lo cual es un proceso complejo e involucra diferentes etapas en el procesamiento, incluyendo transcripción, traducción, translocación, modificaciones postraduccionales como las rupturas de enlaces peptídicos y glicosilaciones, plegamiento y secreción (Kim *et al.*, 2015).

El proceso de secreción de proteínas inicia en el mismo momento que el RNAm se traduce y se transloca el péptido inmaduro a la membrana del retículo endoplásmico (RE) por acción del complejo multimérico SEC61-OST (genes *SEC61*, *SBH1*, *SSS1*, *STT3*, *SWP1*, *WBP1* y *OST1-6*) que además marca a la proteína con un O-oligosacárido. Posteriormente, la proteína entra a la matriz del RE donde se separa el péptido señal (región “pre”) por acción del complejo enzimático señal peptidasa (genes *SPC1*, *SPC2*, *SPC3* y *SEC11*), y diversas proteínas de control de calidad y chaperonas empiezan a interactuar con la proteína a través de su paso por el RE (genes *KAR2*, *ROT1*, *LHS1*, *CNE1*, *YDJ1*, *EPS1*, *SHR3*, *SIL1*, *HTM1* y *UGGT*) donde además

la proteína se N- y/o O-glicosila. La proteína correctamente plegada se transloca al aparato de Golgi donde los oligosacáridos enlazados sufren reducciones y adiciones de más monosacáridos a la cadena (comúnmente manosas). A su vez se remueve el péptido “pro” de la proteína por acción de la endo-proteasa Kex2 y es empacada en una vacuola secretora para ser madurada (en algunos casos) por diversas exo y endo-proteasas (genes *PEP4*, *PRB1*, *PRC1*, *YPS1*, *YPS2*, *YPS3*, y *YPS7*, *MKC7*, *ATG4*, *GPI8*, *HSP31*, *HSP32*, *HSP33* y *SNO4*). Por último, la vacuola libera su contenido al espacio extracelular mediante exocitosis (De Schutter *et al.*, 2009). En la Figura 9 se representa un esquema general de la vía de secreción en levaduras, así como algunos genes que se han sobre-expresado para mejorar la secreción de las proteínas heterólogas.



**Figura 9.** Representación esquemática de la vía de secreción de proteínas en levaduras. Las proteínas para ser secretadas deben entrar por el RE, una acumulación de proteínas mal plegadas conduce a la inducción de la respuesta UPR y a ERAD. Las proteínas correctamente plegadas son transportadas al aparato de Golgi para procesamiento adicional, posteriormente las proteínas pueden ser secretadas o ser canalizadas hacia vacuolas para almacenaje o degradación. Figura tomada de Kim et al., 2015.

UPR: “Unfolded Protein Response”

ERAD: “Endoplasmic reticulum-associated degradation”

Uno de los pasos cruciales en la secreción de proteínas es el plegamiento de la proteína inmadura y la formación de estructuras secundarias y terciarias, junto con la formación de puentes disulfuro en el RE. Este paso es clave debido a que un plegamiento adecuado trae como consecuencia proteínas maduras en su forma activa, por lo tanto, este paso determina en un alto grado la productividad del proceso de producción de proteínas extracelulares y biológicamente activas en *P. pastoris*. Un componente clave de este sistema es la proteína chaperona BiP (gen *KAR2*), la cual



determina el plegamiento correcto de una proteína y su control de calidad a lo largo de todo el proceso dentro del retículo endoplasmático (RE). Se sabe también que esta proteína chaperona está relacionada a procesos de solubilización de péptidos hidrofóbicos, estabilización de subunidades de proteínas oligoméricas y marcaje y re-direccionamiento de proteínas mal plegadas al sistema de degradación de proteosoma.

Cuando este sistema falla debido a factores ambientales y se genera una acumulación de proteínas dentro del RE, se desencadenan procesos que dan a lugar a la secreción y degradación de proteínas mal plegadas tales como la respuesta a proteínas no plegadas en el RE (UPR, por sus siglas en inglés) y la degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico (ERAD por sus siglas en inglés) (Gasser *et al.*, 2008). Se ha reportado que estos mecanismos de respuesta al estrés por acumulación de proteínas en el RE se desencadenan por la sobre-expresión de proteínas en distintos sistemas de expresión eucariotas, incluido *P. pastoris* (Gasser *et al.*, 2008; Resina *et al.*, 2007). Estos dos mecanismos de estrés por acumulación de proteínas se describen a continuación.

El proceso UPR es un proceso de retroalimentación único, debido a su sistema de transducción a través del RE al núcleo de la célula. Cuando se comienzan a acumular péptidos en el RE debido al mal funcionamiento de chaperonas como BiP, la proteína censora Ire1 se auto fosforila, lo que activa un corte del RNAm del factor de transcripción del proceso UPR (gen *Hac1*) para posteriormente producirse la proteína HAC. Este factor de transcripción es responsable de la regulación de cerca de 330 genes, la mayoría relacionados a la biogénesis de organelos secretores, transporte vesicular y formación de lípidos de membrana, haciendo más eficiente la secreción de péptidos (Travers *et al.*, 2000); sin embargo, aumenta la cantidad de proteínas no maduras en el espacio extracelular y además aumenta el funcionamiento del mecanismo de degradación de proteínas ERAD para desahogar el espacio del RE.

ERAD es un proceso complejo en el cual las proteínas mal plegadas son redirigidas al citoplasma, donde son marcadas mediante la enzima ubiquitina y sujetas a degradación por el proteosoma (Travers *et al.*, 2000; Gasser *et al.*, 2008), el cual es un complejo multi-protéico que lleva a cabo la degradación proteolítica total de proteínas en el citoplasma hasta aminoácidos para su posterior reciclaje (Gasser *et al.*, 2008). Este mecanismo funciona en condiciones normales, sin embargo, se ha demostrado que cuando una célula sobre-expresa proteínas, este sistema de

degradación puede aumentar su velocidad y degradar una mayor cantidad de proteínas debido a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (Travers *et al.*, 2000).

Se ha reportado que la cantidad de proteína recombinante secretada al medio de cultivo va en aumento en la fase productiva del bioproceso. A partir de un tiempo del inicio de la inducción la acumulación de la proteína recombinante no solo deje de observarse, sino que comienza a disminuir, a pesar de que el crecimiento celular continua en aumento. Este fenómeno está asociado a la existencia de un sistema proteolítico fuerte de *P. pastoris* (Sinha *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Salamin *et al.*, 2010).

### **2.9.1 Remoción del péptido señal para la secreción de la proteína heteróloga**

La mayoría de los sistemas de expresión para la secreción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* están bajo el control del pre-pro-péptido del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, cuya secuencia se localiza en el extremo amino-terminal de la proteína de interés y que permite la secreción de la proteína al espacio extracelular, previa remoción de este péptido señal (Sreekrishna, 2010). Este proceso de remoción se lleva a cabo en tres pasos, el primero es la remoción de la porción “pre” por la enzima señal peptidasa en el RE, después las proteasas Kex2 y YPS cortan la porción “pro” y al final una región de repeticiones Glu-Ala es removida por la dipeptidil-aminopeptidasa.

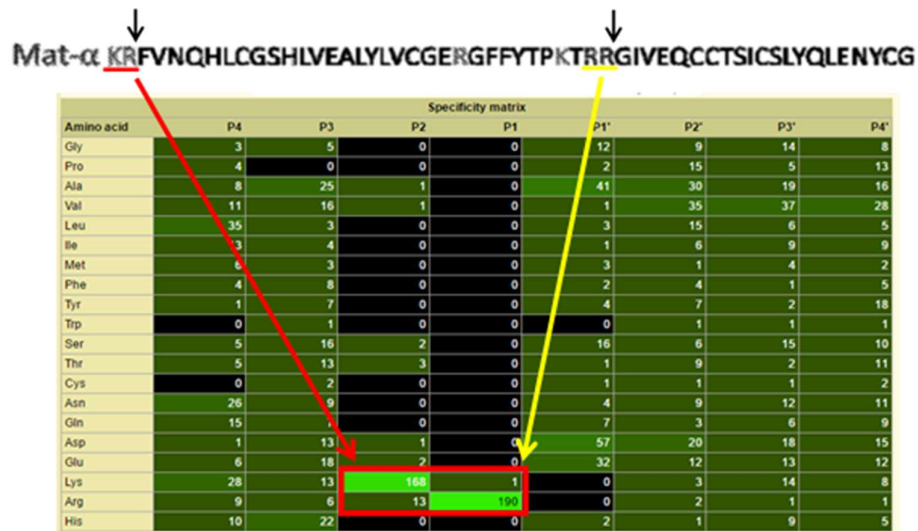
### **2.9.2 La endo-proteasa Kex2 y su interacción con la insulina glargina**

La secreción de proteínas en el medio de cultivo es un método conveniente para obtener grandes cantidades de proteínas recombinantes heterólogas en una forma relativamente pura, sin contaminación de proteínas intracelulares. En las levaduras las proteínas secretadas son expuestas a un número de modificaciones post-traduccionales, incluyendo la formación de puentes disulfuro o enlace S-S (es un enlace covalente fuerte entre grupos tiol (-SH) de dos cisteínas), glicosilación y procesamiento proteolítico (Takahashi *et al.*, 2000). Así, la modificación proteolítica postraducciona en la ruta secretora es esencial para la maduración del precursor de muchas proteínas secretadas de células eucariotas (Rockwell y Thorner, 2004). Las enzimas que escinden el precursor, el C-terminal en un par de residuos de aminoácidos dibásicos, son características de las proteasas serinas tipo subtilisin. La endo-proteasa Kex2 es  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente y enlazada a membrana, la cual se localiza en el último compartimento de Golgi e inicia el procesamiento del factor- $\alpha$  por la incisión del sitio dibásico Lys-Arg (Julius *et al.*, 1984). Los sitios de corte de Kex2 *in vivo* (Lys-Arg/Arg-Arg: KR/RR) han sido reportados (Rockwell *et al.*, 2002). También se

ha indicado que la optimización del corte de Kex2 podría representar un camino eficiente para mejorar la productividad en la secreción de las levaduras y su especificidad hacia el C-terminal del residuo KR (Olsen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2013).

Utilizando herramientas bioinformáticas como, por ejemplo, la base de datos MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>): que es un recurso de información para las peptidasas (denominadas proteasas, proteinasas y enzimas proteolíticas) y las proteínas que las inhiben, podemos identificar las secuencias de aminoácidos para el sitio de corte de la endo-proteasa Kex2, de acuerdo con la matriz mostrada (Figura 10) y la secuencia de pre-pro-insulina glargina. En este caso se ejemplifica, se expone como modelo la acción de Kex2 en el procesamiento de la insulina glargina durante el proceso de secreción en *P. pastoris*.

Los residuos en las posiciones P1, P2, P4 y P1' son fundamentales para la hidrólisis eficaz del sustrato por la proteasa Kex2 (Rockwell y Thorner, 2004). Dos flechas de color negro identifican los sitios potenciales de corte por la endo-proteasa Kex2 dentro de la secuencia de la proteína inmadura. La secuencia de la pro-región del factor alfa (Mat- $\alpha$ ) tiene residuos Lys-Arg dibásicos en el extremo C, y la insulina glargina de cadena sencilla (monocatenaria) tiene residuos Arg-Arg dibásicos que conectan los péptidos de la cadena-B y la cadena A. Ambos sitios son sitios potenciales de procesamiento de proteasa Kex2. Las flechas de color rojo y amarillo identifican, además, la preferencia de los residuos de aminoácidos para realizar el corte enzimático por Kex2.



**Figura 10.** Matriz específica para la endo-proteasa Kex2 que muestra la secuencia de los sitios de corte, basados en los datos de 191 reportes. Sitio de corte (a la derecha de Lys-Arg) entre la secuencia señal y proteína insulina glargina. Adicionalmente se muestra el sitio Arg-Arg, donde debe de cortar dicha enzima para la secreción al medio de cultivo de la insulina glargina como proteína madura (como dos cadenas polipeptídicas). Figura tomada de la base de datos MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>).

La proteasa Kex2 es una proteína compuesta por 814 residuos de aminoácidos con un segmento transmembráneo cerca del C-terminal (cola C-terminal muy ácida), con una cola de aminoácidos hidrófobos, lo cual separa el dominio N-terminal que contiene homología con la familia subtilisin de la serina proteasa. Un análisis de la delección de la parte C-terminal de Kex2 ha demostrado que la región no es requerida para la actividad enzimática (Fuller *et al.*, 1989). El producto de la expresión de la forma soluble de Kex2, que le faltan 201 aminoácidos del C-terminal, fue secretado en considerables cantidades en el medio de cultivo y todavía retiene la actividad enzimática (Brenner y Fuller, 1992).

Muchos ejemplos se han reportado con el sistema de secreción de la fusión de la proteína heteróloga con la secuencia líder del prepro-factor- $\alpha$ , el cual presenta el sitio de corte de Kex2. Cuando estas proteínas son procesadas correctamente hacia el sitio “blanco”, la reacción de Kex2 puede estar limitado en la velocidad de procesamiento y secreción. De hecho, una parte de las proteínas secretadas fueron detectadas en el medio de cultivo teniendo todavía la secuencia líder pro-factor- $\alpha$  (Kjeldsen *et al.*, 1999a). La mezcla de las formas de la proteína recombinante, completamente y no escindida, perturba la purificación. Por tanto, para el mejoramiento del sistema de expresión podría considerarse la co-expresión de Kex2, demandante para completar dicho procesamiento.

El procesamiento completo de una proteína por la sobre expresión de Kex2 ha sido reportado (Korhola y Nevalainen, 1987; Sreenivas *et al.*, 2015). Sin embargo, en otros trabajos no ha sido posible obtener completamente el procesamiento de la proteína recombinante aún con la co-producción de Kex2 (Takahashi *et al.*, 2000). Esta discrepancia puede ocurrir debido a la diferencia en las cantidades de proteína secretadas o en la diferencia de la estructura tridimensional alrededor del sitio de corte, haciendo el acceso difícil para la endo-proteasa Kex2, con un enfoque de sitios estéricamente “oculto” (Fuentes-Garibay *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2017). Además, debería de tomarse en consideración la velocidad de degradación de Kex2 y su capacidad de procesamiento en el compartimento de Golgi (Takahashi *et al.*, 2000).

La endo-proteasa Kex2 (sin los aa del C-terminal para el anclaje a membrana) (Brenner y Fuller, 1992; Gluschankof y Fuller, 1994) fue usado “*in vitro*” para escindir la fusión de una proteína con la secuencia líder del factor- $\alpha$ , que tiene el sitio de corte de Kex2. Al contrario de tales experimentos, otros resultados mostraron el completo procesamiento de la proteína recombinante cuando fue co-expresada con Kex2 (sin los aa del C-terminal para el anclaje a membrana) (Takahashi *et al.*, 2000). Otro estudio sugiere que la eficiencia de corte de Kex2 puede ser mejorada por la optimización del contexto del sitio de corte de Kex2 y por el incremento del número de copia de *KEX2* en el genoma, así la eficiencia en la secreción podría ser mejorada (Yang y Zhang, 2017).

## **2.10 Expresión de insulina en levaduras (*Pichia Pastoris*)**

Numerosos estudios han demostrado la utilidad de *P. pastoris* para la producción de precursores de insulina humana y sus análogos utilizando cepas Mut<sup>+</sup> o Mut<sup>s</sup> (Kjeldsen *et al.*, 1999a; Kjeldsen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; País *et al.*, 2003; País-Chanfrau *et al.*, 2004; Mansur *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2008; Jian-Kun *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Gurramkonda *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2013; Sreenivas *et al.*, 2015; Baeshen *et al.*, 2016; Polez *et al.*, 2016; Sreenivas *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Roth *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Thongyoo *et al.*, 2019).

La region pre-pro del factor- $\alpha$  de *S. cerevisiae* es la secuencia señal más empleada para la exportación de proteínas heterólogas en levadura. La pro-insulina y el precursor de insulina fueron expresados en levadura usando diferentes secuencias señal para facilitar la secreción (Kjeldsen *et al.*, 1999b). En este caso, el fragmento de ADN que codifica para la proteína fusión se construyó de la siguiente forma:

Péptido señal – pro-leader – KR – espaciador – PI

Donde PI (precursor de insulina) y KR es el sitio potencial de procesamiento de la endo-proteasa Kex2.

La expresión de la proteína fusión del péptido líder del factor- $\alpha$  y pro-insulina en *P. pastoris* no resultó en la secreción de la pro-insulina (Kjeldsen *et al.*, 1999a). Sin embargo, la producción de la insulina humana recombinante con el péptido espaciador completo (pro-insulina) en *P. pastoris* fue reportado recientemente (Baeshen *et al.*, 2016). Kjeldsen y colaboradores reportaron que al remplazar el péptido-C de la insulina por un péptido corto de conexión (AAK) y unido con el factor- $\alpha$  tuvo una eficiente secreción para el precursor de insulina (Kjeldsen *et al.*, 1999b). Así, otros trabajos han reportado la expresión del precursor de la insulina humana (País-Chanfrau *et al.*, 2004; Mansur *et al.*, 2005). En *P. pastoris* se han hecho varios intentos para la obtención del precursor de insulina con altos niveles, empleando cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>s</sup> (Tabla 4).

**Tabla 4.** Expresión de insulina en cepas de *Pichia pastoris*.

Molécula	Hospedero	Promotor	cultivo	Temperatura (°C) y pH	Tiempo de inducción (h)	Insulina en el sobrenadante de cultivo (g/L)	gDCW/L	Referencia
PI	GS115 Mut <sup>+/s</sup>	<i>AOX</i>	F-16L	30°C y pH 5.0	87	1.5	nd	Wang, 2001
MPI	GS115 Mut <sup>s</sup>	<i>AOX</i>	F- 7 L	30°C y pH 4.6	72	0.22	80-90	País, 2003
MPI	GS115 Mut <sup>s</sup>	<i>AOX</i>	F- 2.5 L	22°C y pH 6.2	110	0.295	89	País-Chanfrau, 2004
MPI	GS115 Mut <sup>s</sup>	<i>AOX</i>	F- 2.5 L	28°C y pH 5.0	136	0.246	109	Mansur, 2005
PI	GS115 Mut <sup>s</sup>	<i>AOX</i>	F- 16 L	30°C y pH 5.0	72	3.6	705	Xie, 2008
PIP	GS115 Mut <sup>+</sup>	<i>AOX</i>	Matraz	30°C y pH 5.0	96	0.181	nd	Zhu, 2009
PI	X-33 Mut <sup>+</sup>	<i>AOX</i>	F- 15 L	30°C y pH 5.5	88	3.84	59	Gurramkonda, 2010
PI	X-33 Mut <sup>+</sup>	<i>AOX</i>	Matraz	30°C y pH 5.0	72	0.38	nd	Gong, 2013

Insulina glargina de dos cadenas	GS115 Mut <sup>+</sup>	<i>AOX</i>	Matraz	30°C y pH 6.0	96	0.075	nd	Sreenivas, 2016
Insulina glargina de dos cadenas	GS115 Mut <sup>+</sup>	<i>AOX</i>	Matraz	30°C y pH 6.0	96	0.056	nd	Sreenivas, 2015
PI	GS115 Mut <sup>+</sup>	<i>AOX</i>	F-5L	30°C y pH 3.5	110	6.69	> 500	Jinjia-Wang, 2018
PI	GS115	<i>GAP</i>	F-5 L	30°C y pH 3.5	110	2.46	> 650	Wang, 2017
	KM71H					4.79 (mg/L)		
PI	GS115 (Mut <sup>+</sup> )	<i>AOX</i>	Matraz	30°C y pH 6.0	72	~ 3.5 (mg/L)	nd	Thongyoo, 2019
	X33 (Mut <sup>+</sup> )					~ 1.9 (mg/L)		
PI	KM71H	<i>AOX</i>	Matraz	30°C y pH 5.0	144	Refieren en %	nd	Amadea, 2019
PI	X33	<i>AOX</i>	Matraz	30°C y pH 5.0	72	30 (mg/L)	nd	Nurdiani, 2018
Insulina glargina monomérica	Mut <sup>s</sup>	<i>AOX</i>	F-7 L	24°C y pH 5.0	50	0.122	82	Nuestro

PI: Precursor de insulina humana. MPI: Mini pro-insulina. PIP: Precursor de insulina porcina. gDCW/L: Densidad celular en peso seco. F: Fermentador. Nd: no determinado.



En el caso específico de la insulina glargina la molécula fue expresada y secretada al medio de cultivo como una simple cadena, o sea precursor de insulina, conteniendo la cadena B seguida de la cadena-A, pero sin el péptido-C de conexión. El precursor de insulina es tratado con tripsina para separar la cadena A y B y ser convertido en un producto de dos cadenas (Hazra *et al.*, 2009), o sea insulina madura. Debido a que la secuencia de la cadena B de la insulina glargina tiene residuos internos de Lys-Arg (Figura 2), luego del tratamiento con tripsina se obtienen un alto número de fragmentos de impurezas. Por tanto, para mejorar el proceso de purificación se explora la ventaja de la proteasa Kex2 la cual escinde específicamente en el C-terminal de los residuos de aminoácidos Lys-Arg y Arg-Arg (Sreenivas *et al.*, 2015).

Baeshen y colaboradores trabajaron con el principal objetivo de explorar la producción a gran escala de insulina humana recombinante (Baeshen *et al.*, 2016). En este caso se expresó el precursor de insulina con el péptido-C integro (producto no disponible comercialmente). Los ensayos biológicos demostraron la eficacia de la insulina recombinante, con el péptido-C integro, para disminuir los niveles de glucosa en ratones diabéticos, demostrándose que la molécula recombinante es funcionalmente activa. Se pensó que el péptido-C es biológicamente inactivo. Sin embargo, pocos estudios han mostrado la significancia del péptido-C en el tratamiento de complicaciones diabéticas (Wahren, 2004).

La expresión del precursor de insulina porcino y un simple procedimiento para la purificación del producto fue reportado (Wang *et al.*, 2001). Fermentación a volumen de 16 L fue usado, obteniéndose una concentración de 1.5 g/L del precursor de insulina en el sobrenadante del medio de cultivo. La conversión del precursor de insulina humana se realizó mediante una reacción de transpeptidación, alcanzando una conversión de más del 80%. Solamente un residuo localizado en la posición B30 es diferente entre la insulina humana (ThrB30) y porcina (AlaB30), y la insulina porcina puede ser convertida en insulina humana mediante un proceso de transpeptidación en presencia de tripsina y Thr (Moriyama *et al.*, 1979). Finalmente, se realizaron dos pasos de purificación cromatográficos para alcanzar una alta pureza del producto.

Mansur y colaboradores (Mansur *et al.*, 2005) reportaron el mejoramiento de los niveles de expresión la mini pro-insulina (B1-29-Lys-Arg-A1-21) en *P. pastoris* al incrementar el número de copia integrada en el casete de expresión. Los resultados muestran que con una copia en la integración se alcanza 18.6 mg de mini

pro-insulina/L y se incrementa hasta 246 mg de mini pro-insulina/L cuando el número de copia integrado fue de 11.

Se mejoró la expresión de la insulina glargina como una doble cadena cuando se sobre expresa la endo-proteasa Kex2 (Sreenivas *et al.*, 2015). Primeramente, cuando la glargina fue expresada en *P. pastoris*, solo el 3% de la proteína recombinante fue secretada al medio de cultivo como dos cadenas polipeptídicas, posterior al procesamiento por la endo-proteasa Kex2 en el sitio de residuos de aminoácidos Arg-Arg en el C-terminal de la cadena-B (Arg31B-Arg32B) y el resto de la molécula es secretada como una sola cadena (precursor de glargina). La hipótesis fue que las cantidades de Kex2 no fueron suficientes para la conversión de toda la proteína recombinante. De esta forma se procedió a experimentar si la mayoría del precursor de insulina glargina como una sola cadena puede ser convertida a doble cadena “*in vivo*”. Así, se demostró que la sobre co-expresión de Kex2, bajo el promotor inducible FLD1, mejoró la eficiencia de procesamiento de la proteína recombinante, alcanzando más del 90% como cadena doble. De esta forma la estrategia mencionada para generar una molécula procesada en dos cadenas directamente en el medio de cultivo elimina los obstáculos implicados en la eliminación de muchas impurezas relacionadas con el producto que surgen durante el proceso de purificación y transpeptidación y reduce el costo de la producción a nivel comercial. Recientemente se demostró que la cepa de *P. pastoris* Mut<sup>s</sup> fue superior a cepas Mut<sup>+</sup> (*P. pastoris* X-33 y GS115) en términos de producción de proteína recombinante precursor de insulina (Thongyoo *et al.*, 2019).

## **2.11 Mercado de las insulinas**

### **2.11.1 Mercado global**

De acuerdo con investigaciones, el mercado global de insulina fue valorado en 20 mil millones de dólares en el 2012 y debió alcanzar los 32 mil millones de dólares en el 2019 (Heinemann y Hompesch, 2019), pudiendo llegar a 45 mil millones de USD para el 2027 (<https://www.ihealthcareanalyst.com/>, acceso en diciembre de 2020). Específicamente, la insulina glargina abarca un mercado de más de 7.5 mil millones de dólares en el 2013 (Heinemann, 2015). Así, el mercado de la insulina es uno de los mercados más grandes para una sola clase de fármacos.

Según la FID el 90% de los diabéticos son de tipo 2. Se estima que el consumo de insulina entre los pacientes diabéticos tipo 2 está entre un 15-23% del total de personas afectados por esta enfermedad (<https://idf.org/>). Hoy día alrededor de

100 millones de personas en el mundo necesitan insulina (Wirtz *et al.*, 2016). Sin embargo, el precio de este importante medicamento sigue aumentando. James Collip y Charles Best vendieron la patente de insulina a la Universidad de Toronto por solo \$ 1.00 (USD) pues querían que todos los que necesitaban el medicamento pudieran accederlo. Sin embargo, aunque la insulina ha sido usada para el tratamiento de la diabetes por casi 100 años, globalmente más de la mitad de las personas necesitadas no tienen acceso al producto debido a su alto precio. Por ejemplo, los precios de la insulina en los Estados Unidos casi se han triplicado entre 2002 y 2013 (Danne *et al.*, 2013)

La mayoría de los pacientes diabéticos se identifican en 121 países. Novo Nordisk tiene sus productos registrados y vende en 111 de ellos, Sanofi en 101 y Eli Lilly en 94 ([https://publications.iadb.org/publications/english/document/A-Rising-US\\$-750-Billion-Market-Unlocking-Opportunities-at-the-Base-of-the-Pyramid-in-Latin-America-and-the-Caribbean.pdf](https://publications.iadb.org/publications/english/document/A-Rising-US$-750-Billion-Market-Unlocking-Opportunities-at-the-Base-of-the-Pyramid-in-Latin-America-and-the-Caribbean.pdf), acceso en febrero de 2021). Estas tres compañías comparten más del 90% del mercado mundial (Tabla 5).

**Tabla 5.** Principales compañías que fabrican y comercializan insulina.

Posición en el mercado mundial	Nombre de la compañía	Sede	# Países donde venden	% del mercado de las insulinas (por ingresos)	Principales productos de insulinas
1	Novo Nordisk	Dinamarca	111	41	Actrapid®, Insulatard®, Mixtard®, NovoLog®, NovoRapid®, NovoMix®
2	Sanofi	Francia	101	32	Apidra®, Insuman®, Lantus®
3	Eli Lilly	EE.UU.	94	20	Humalog®, Humilin®
4	Bioton	Polonia	26	no se conoce	Gensulin®, SciLin®
5	Wockhardt	India	17	no se conoce	Wosulin®
6	Biocon	India	17	no se conoce	Basalog®, Insugen®
7	Julphar	Emiratos Árabes Unidos	13	no se conoce	Jusline®

### 2.11.2 Mercado en México

México es uno de los países de mayor crecimiento económico en el área de América latina y el Caribe. Además, el número de personas que debutan con diabetes es creciente (Williams *et al.*, 2020) y por consiguiente el mercado de la insulina es igualmente creciente.

De acuerdo con un estudio dirigido por el Instituto Nacional de Salud Pública, la DM le costó al país 7,784 millones de USD en 2010 (Arredondo *et al.*, 2011). Se estimó que los costos directos totales, es decir, los recursos gastados en consultas, diagnóstico, medicamentos, hospitalización y complicaciones fueron de aproximadamente 45.7 mil millones de pesos (3425 millones de dólares) en 2011. Se calculó también que, para ese año, los costos indirectos totales (es decir, los derivados de mortalidad prematura, discapacidad permanente y discapacidad temporal) fueron de aproximadamente 57.5 mil millones de pesos (4304 millones de dólares) en el mismo año (Arredondo *et al.*, 2011). Según la fundación idea (<http://www.fundacionidea.org.mx/>), esta cifra representa 15% del presupuesto total que México invierte en salud y es superior en un 50% al presupuesto total del principal programa de atención a la pobreza y oportunidades (<http://fmd diabetes.org/wp-content/uploads/2014/10/Diabetes-2014.pdf>, acceso en febrero de 2021). Se estimó que, por cada 100 pesos gastados en el tratamiento de la diabetes, 52 pesos los gastan los pacientes con gastos de bolsillo y 48 pesos los gasta el Gobierno (Flórez *et al.*, 2016). Visto de otra forma el costo de atención de la DM representó el 0.74 por ciento del PIB de México. Si se considera que el gasto total en salud representa el 6.2 por ciento del PIB, entonces el gasto en DM absorbió casi una sexta parte del gasto total ejercido en salud. En otras palabras, el costo de la DM fue mayor al presupuesto destinado al desarrollo social (0.71 por ciento del PIB) o al gasto federal en ciencia y tecnología (0.44 por ciento del PIB) ([http://fundacionidea.org.mx/storage/IDEA/files/Diabetes-2014\\_1536702743.pdf](http://fundacionidea.org.mx/storage/IDEA/files/Diabetes-2014_1536702743.pdf), acceso en febrero de 2021). Sin embargo, según la Fundación Mexicana para la Salud (FUNSALUD), para el 2013 la carga económica de la DM se estimó el 2.25% del PIB de ese mismo año (Barraza-Lloréns *et al.*, 2015). De cualquier modo, estas cifras son realmente alarmantes, datos recientes mostraron que el monto total por diabetes en 2017 fue superior a los 9 mil millones de dólares. Incluye 4200 millones en costos directos y más de 5300 millones en costos indirectos (Arredondo *et al.*, 2019).

La información sobre la oferta y la demanda de insulina no es fácil de disponer (Wirtz *et al.*, 2016) y mucho menos datos actualizados. Algunos informes de mercado han proporcionado datos sobre la producción de insulina de fábricas en cada país, pero no dan los datos comparables y consistentes sobre el mercado particular. En México los costos totales de la DM han sido documentado, sin embargo, las estimaciones son muy variadas, con cifras de costo de atención al paciente que van desde 700 hasta 3200 dólares anuales por pacientes.

En cuanto al gasto en los medicamentos (hipoglucemiantes e insulina) se calculó en 4316 millones de pesos. Siendo el porcentaje del gasto en insulina entre el 75-95% del total, según la instancia sanitaria, sin tener en cuenta el sector privado (Molina *et al.*, 2015). De esta forma podemos calcular que el segmento del mercado de la Insulina en México oscila entre 3.2-4.1 mil millones de pesos. Teniendo en cuenta el número de diabéticos en México, mencionado anteriormente, un estimado del 13% de ellos que necesitan insulina (Jiménez *et al.*, 2016) y el rango del costo de la atención al paciente, podemos estimar que el mercado de las insulinas está entre 1.2-5.7 mil millones de pesos.

### 3 JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es uno de los principales problemas de salud pública. México es el sexto lugar con mayor número de personas diabéticas a nivel mundial. Esta enfermedad representa hoy día la segunda causa de muerte en el país. Para muchos pacientes, el control eficaz de los niveles de glucosa en sangre solo se puede alcanzar mediante la administración exógena de insulina. Debido al incremento del número de personas diabéticas en los últimos años, la demanda de este medicamento (insulinas) se ha incrementado también y por tanto es necesario una mayor producción. Un estudio del mercado para las diferentes variantes farmacológicas de insulinas en el sector público de México permitió estimar el mercado global nacional de insulinas y un segmento del mercado de interés para una variante farmacológica de la insulina humana, insulina glargina. El análisis técnico económico en función de la demanda condujo a evaluar la factibilidad técnica y económica de un proceso para la producción de un producto de esta naturaleza.

El desarrollo de la industria biotecnológica moderna ha permitido la producción a escala industrial de polipéptidos de interés farmacéutico e industrial. Debido a las ventajas de la levadura *P. pastoris*: altos niveles de producción y secreción de la proteína heteróloga, fácil manipulación genética y la posibilidad de desarrollar cultivos controlados a escala de laboratorio hacen de este microorganismo una opción viable para la producción de productos biofarmacéuticos a escala industrial. Por tanto, el modelo de *P. pastoris* ofrece una oportunidad para desarrollar un proceso económicamente rentable y escalable para la producción de insulina glargina.

Por todo lo anterior, en este trabajo se propuso la producción de insulina glargina con el sistema de expresión de *P. pastoris*, empleando el promotor AOX (gen *AOX*) inducible con metanol, con su desarrollo se aportó el conocimiento sobre la producción a escala de laboratorio de productos biofarmacéuticos, lo cual servirá de plataforma experimental para la introducción en esta industria. Además, el desarrollo de un proceso productivo para obtener dicha proteína con alta pureza ofrece una alternativa a desarrollar un producto biofarmacéutico a escala industrial.

## **4 HIPÓTESIS**

El análisis técnico económico de los procesos de producción de proteínas recombinantes con el sistema de *Pichia pastoris*, permitirá el diseño de un proceso económicamente rentable y escalable para la producción de insulina humana en este sistema de expresión.



## 5 OBJETIVO

### Objetivo General

Diseñar e implementar un proceso económicamente rentable y escalable para la producción de insulina humana en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*.

### Objetivos específicos

1. Definir las características de un proceso económicamente rentable y escalable que permita la producción de insulina humana en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*.
2. Construir una cepa recombinante de expresión en *Pichia pastoris* que permita la producción económicamente rentable y escalable de insulina humana.
  - ✓ Definir la secuencia codificante de la insulina humana que se quiere obtener por vía recombinante.
  - ✓ Definir los elementos que conformarán el vector y la cepa).
  - ✓ Construir los vectores de expresión y las cepas recombinantes de *Pichia pastoris* portadoras del gen de la insulina humana capaces de producir y secretar la proteína.
3. Diseñar e implementar procesos que permitan la producción económicamente rentable y escalable de insulina humana con los sistemas de expresión de *Pichia pastoris* construidos.
  - ✓ Determinar las condiciones de cultivo que permitan la producción de insulina humana recombinante con los sistemas de expresión de *Pichia pastoris* construidos.
  - ✓ Evaluar los procesos para la producción de la insulina humana recombinante en biorreactor a escala de laboratorio y demostrar la factibilidad económica y de escalamiento de los procesos evaluados.

## 6 MATERIAL Y METODOS

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) y la planta piloto de fermentación pertenecientes al Instituto de Biotecnología (IB) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

### 6.1 Cepas, plásmidos, composición de medios, reactivos químicos y enzimas

La cepa *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> (arg4 his4 aox1::ARG4), el vector de expresión pPIC9 y la cepa TOP10 de *E. coli* usada como hospedero de clonación y sub-clonación, se obtuvo del cepario del laboratorio L5 del IB-FCB-UANL. La cepa KM71pPIC9 se construyó previamente mediante la transformación de células electro-competentes KM71 de *P. pastoris* con el vector pPIC9, digerido previamente con la enzima de restricción SalI. La secuencia de nucleótidos codificante *ILGXN* se diseñó con una longitud total de 182 pb, fue sintetizada, clonada en el plásmido pUC57 y secuenciada por BioBASIC Inc. (Markham, Ontario, Canadá) (Sección 11.2).

Las endonucleasas de restricción XhoI y NotI fueron adquiridas de la casa comercial New England Bio-labs (Beverly, MA, EE.UU.) y la enzima SalI de Promega (Madison, WI, EE.UU.). El marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder GoTaq DNA polimerasa y T4 DNA ligasa se obtuvieron de Promega (Madison, WI, USA). Todos los oligonucleótidos fueron adquiridos de la casa comercial Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT, Coralville, IA, EE.UU.).

El medio Luria Bertani (LB), las cajas con medio LB-agar y LB-Amp., el medio de regeneración base de dextrosa (RDB), el medio de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD), las cajas con medio YPD-agar, RBD-His<sup>-</sup>-agar, el medio mínimo amortiguado con glicerol (BMG) y el medio mínimo amortiguado con metanol (BMM) se prepararon de acuerdo con el manual del kit de expresión de *Pichia* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La base nitrogenada de levaduras (YNB) sin aminoácidos se adquirió en Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Las sales trazas PTM1 se prepararon como se describe en (Stratton *et al.*, 1998). La insulina glargina comercial (Galactus) fue adquirida de los Laboratorios PiSA S.A. de C.V. (Guadalajara, JAL, México). Todos los reactivos fueron de grado analítico y se compraron en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.) o de Productos Químicos Monterrey (Monterrey, NL, México). Se utilizó el marcador de peso molecular (“Ultra low-range molecular weight marker”, Sigma-Aldrich Co. EE.UU.) para los análisis

por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

La preparación de todos los medios y soluciones amortiguadores se encuentra descrito en la sección de apéndices.

## **6.2 Equipos principales**

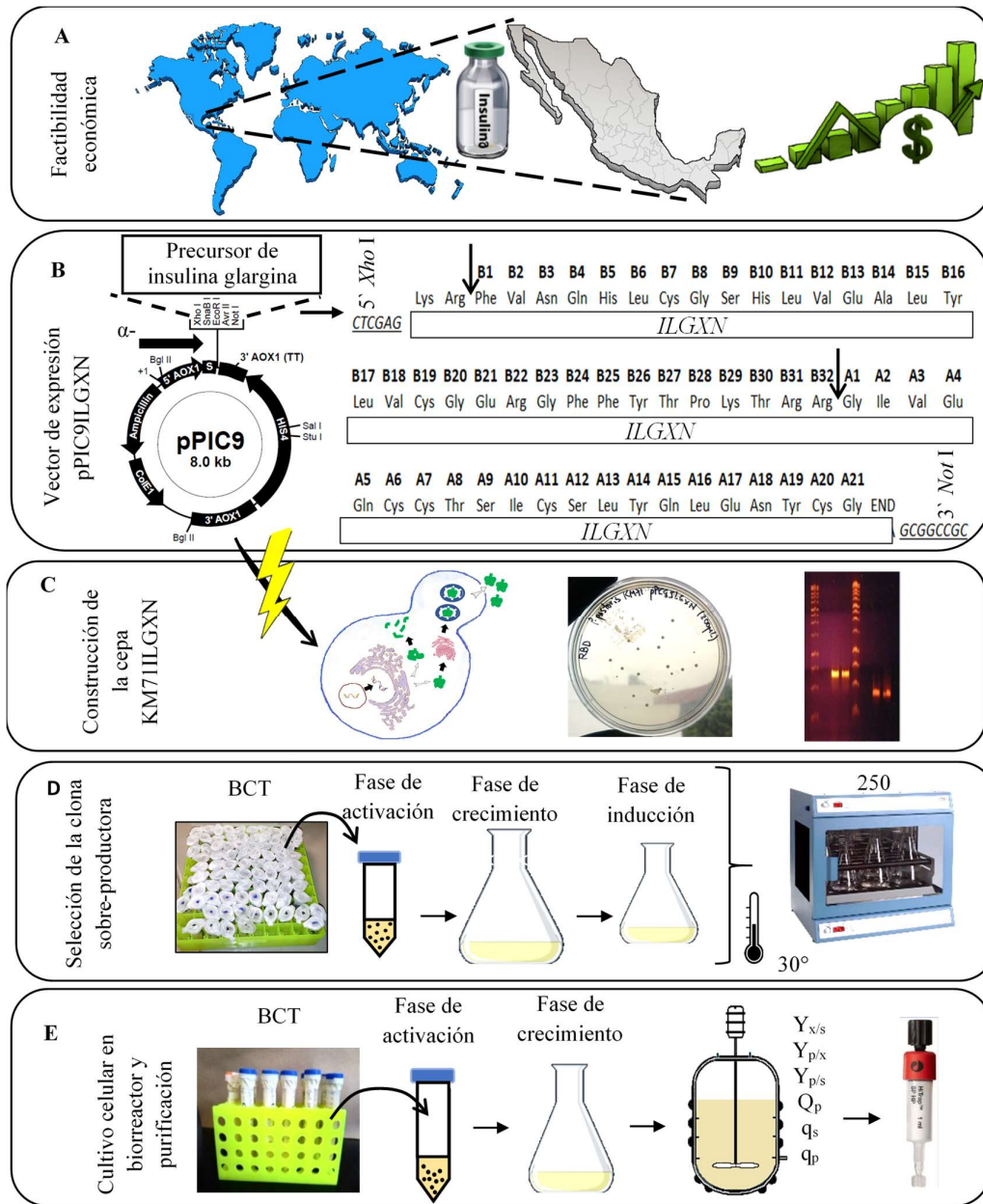
Los principales equipos utilizados para el desarrollar este trabajo fueron: Centrífuga (HERMLE Labortechnik, modelo Z326K, Wehingen, Alemania), potenciómetro de la casa comercial Beckman (IN, EE.UU.), campana microbiológica de flujo laminar de Labconco Co. Inc. (Kansas City, MO, EE.UU.), incubadora FE-131 (Felisa, Jalisco, México), 3 refrigeradores (Torrey, Monterrey, NL), balanza granataria (WM Ainsworth And Sons Inc., Denver, Colorado, EE. UU.), balanza analítica (Mettler Toledo, modelo 285, Suiza), espectrofotómetro modelo SmartSpect™ 3000 (Bio-Rad, California. EE.UU.), concentrador a vacío de Labconco Co. Inc. (Kansas City, MO, EE.UU.). NanoPhotometer® Pearl (NanoPhotometer Pearl, Impln GmbH, Munich, Alemania), incubadora con agitación LAB-LINE (MA, EE.UU.). Las esterilizaciones se realizaron en la autoclave Aesa modelo CV300 (AESA, Edo. de México, México) a 121°C, 15 lb/pulg<sup>2</sup> y 20 min.

## **6.3 Estrategia general**

Para el cumplimiento de los objetivos propuesto en este trabajo, se siguió la siguiente estrategia: Se realizó un estudio para definir las características de un proceso escalable y económicamente rentable para la producción de la insulina humana en el sistema de expresión de *P. pastoris* (Figura 11A). Este estudio condujo a la selección de una variante farmacológica de la insulina humana, un análogo, para obtener por vía recombinante (Figura 11B). Seguidamente se prosiguió con la construcción del casete de expresión (pPIC9ILGXN) y la transformación de las cepas de *P. pastoris* (fenotipo Mut<sup>s</sup>), capaz de producir y secretar al medio de cultivo la insulina glargina (producto de interés previamente seleccionado) (Figura 11C). Un transformante seleccionado al azar se cultivó a pequeña escala (Matraces Erlenmeyer de 250 mL) bajo condiciones de inducción con metanol (MeOH) hasta 96 h y el medio de cultivo libre de células se analizó por diferentes técnicas analíticas (SDS-PAGE, RP-HPLC y EM); así se demostró la presencia del producto recombinante como la principal proteína extracelular. El análisis de todas las clonas recombinantes se realizó mediante cultivos a pequeña escala (Matraces Erlenmayer de 250 mL), utilizando como criterio de selección los valores normalizados con respecto al máximo valor del rendimiento de

proteínas extracelular/biomasa y el análisis por RP-HPLC (Figura 11D). La cepa que cumplió con el mayor valor de rendimiento de proteínas extracelulares/biomasa y que secretó la proteína recombinante (analizada por RP-HPLC y SDS-PAGE) se seleccionó como la cepa sobre-productora. Dicha cepa se volvió a cultivar en medio sólido (cajas Petri con LB-Amp.) y se analizaron las sub-clonas seleccionadas, siguiendo el criterio descrito previamente. Finalmente, se seleccionó una clona sobre-productora de *P. pastoris* KM71ILGXN (Figura 11D). Luego se evaluó el crecimiento celular en condiciones de inducción con MeOH para estudiar la influencia del gen heterólogo en el crecimiento celular. En esta etapa se realizaron cinéticas de crecimiento hasta 14 h, mediante cultivos a pequeña escala (Matraces Erlenmeyer de 250 mL) y se determinó la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación.

Una vez seleccionada la cepa sobre-productora y finalizada la evaluación del crecimiento celular en condiciones de inducción, comenzaron los trabajos en el biorreactor. Se consideraron dos factores en el estudio: la temperatura (24 y 28°C) y la estrategia de adicionar el MeOH (MLFB y MNLFB). Se correlacionó la producción volumétrica extracelular de insulina, durante la etapa de inducción con MeOH, con la respuesta fisiológica del hospedero, evaluada mediante el consumo de MeOH, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), el rendimiento celular proveniente de metanol ( $Y_{x/s}$ ), el rendimiento de la producción extracelular de insulina/biomasa ( $Y_{p/x}$ ), el rendimiento de la producción extracelular de insulina proveniente de MeOH ( $Y_{p/s}$ ) y la velocidad específica de consumo de metanol ( $q_s$ ). Se determinaron los parámetros de productividad volumétrica ( $Q_p$ ) y la velocidad específica de formación de producto ( $q_p$ ) (Figura 11E). Finalmente se implementó un proceso de purificación, a escala de laboratorio, para la obtención del producto recombinante con alta pureza (Figura 11E).



**Figura 11.** Estrategia general del proyecto. **A).** Evaluación del mercado global y en México de las insulinas y estudio de factibilidad técnica y económica. **B)** Plásmido integrativo pPIC9 usado para la transformación de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup>. Derecha, el gen *ILGXN* (no mostrado) que codifica para el precursor de insulina glargina, dicha secuencia nucleotídica se clonó entre el sitio de restricción XhoI de la secuencia señal del factor alfa y NotI dentro del sitio múltiple de clonación. Derecha, secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de acuerdo con las cadenas A y B del polipéptido del precursor de insulina glargina. Las flechas denotan los sitios potenciales de corte de la endo-proteasa Kex2. Los sitios de restricción nucleotídica 5' y 3' se muestran en *italica*. **C)** Construcción de la cepa recombinante *P. pastoris* KM71ILGXN. **D)** Selección de la cepa sobre-productora. **E)** Experimentos en biorreactor y purificación.

#### **6.4 Definición de las características de un proceso escalable y económicamente rentable para la producción de insulina humana en el sistema de expresión de *Pichia pastoris***

Con el fin de definir una variante de la insulina humana cuya demanda permitiera definir un proceso escalable y económicamente rentable empleando el sistema de expresión de *P. pastoris* se realizó un estudio de mercado de la demanda de las diferentes variantes farmacológicas de insulinas en el sector público de México y luego un segmento del mercado de interés. En función de la demanda y el mercado se seleccionó una variante farmacológica y sobre la cual se realizó un estudio de factibilidad técnica y económica teniendo como plataforma de producción el sistema de *P. pastoris*. Para cumplir con este objetivo se definió el prototipo del producto y el tamaño del mercado a enfocarse, según datos del IMSS (<http://www.imss.gob.mx/>)

##### **6.4.1 Proyecciones de producción**

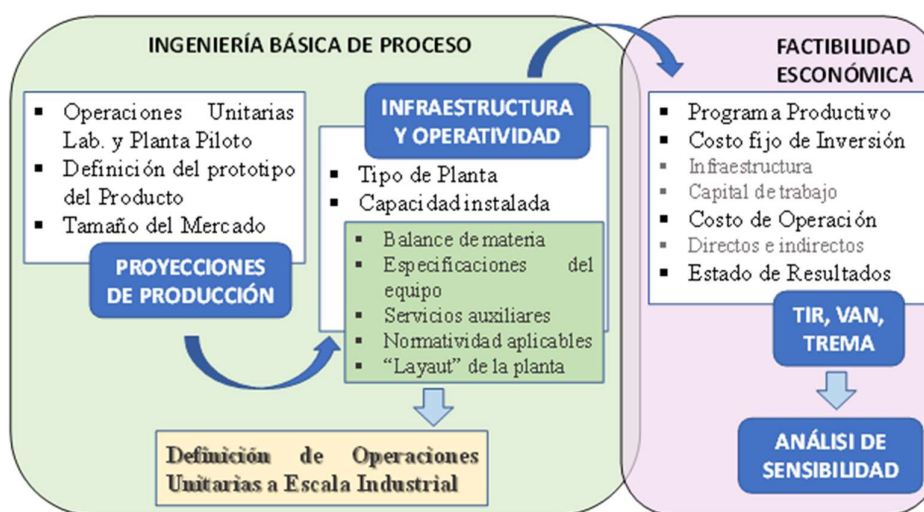
Primeramente, se estimó el mercado mundial de las insulinas. Luego se estimó el mercado global de los productos de la diabetes en México y para las diferentes variantes farmacológicas de insulinas e hipoglucemiantes, en el sector público. Luego se estimó el porcentaje correspondiente al valor del mercado global de las insulinas. El segmento del mercado modelo en este estudio se realizó según las compras realizadas por el IMSS entre 2014-2016. De esta forma se definió el prototipo del producto a evaluar. Según la estrategia de obtención del producto prototipo, en el modelo de expresión en células de *P. pastoris*, se definieron los pasos básicos de un proceso de producción. Así, se calculó el volumen efectivo en el fermentador para poder producir y satisfacer una fracción de la demanda del IMSS, en función de diferentes magnitudes como son: concentración del producto recombinante secretado al medio de cultivo, número de lotes a necesarios y la recuperación total del producto recombinante en el proceso productivo (Figura 12).

### 6.4.2 Infraestructura

Según las necesidades de producción (escala de producción) se realizó un estimado de la capacidad en infraestructura y operativa de una planta de producción de biofármaco. Según el prototipo evaluado, se definieron las operaciones unitarias de un proceso que cumpliera con las expectativas del tamaño del mercado definido anteriormente (Figura 12).

### 6.4.3 Factibilidad económica

Una vez definidas las operaciones unitarias a nivel industrial se realizó el programa productivo y se calcularon los costos (costos fijos de operación y de producción). Finalmente, se realizó una primera evaluación de la factibilidad del proyecto a través de los indicadores económicos VAN y TIR (Figura 12).



**Figura 12.** Metodología general para el análisis técnico-económico de un proceso industrial para la producción de una proteína recombinante en *Pichia pastoris*. TIR: Tasa interna de retorno. VPN: Valor presente neto. TREMA: Tasa de retorno mínima atractiva. Figura tomada de Chuck-Henández C, Calvillo-Murillo J, Viader-Salvadó JM y Guerrero-Olazarán M. Aspectos relevantes en la evaluación técnico-económica de un proceso industrial para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Cartel en XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Junio de 2015, Guadalajara, Jalisco, México.

#### **6.4.4 Selección de la variante farmacéutica de insulina**

Como producto prototipo a evaluar se seleccionó un análogo de la insulina humana, la insulina glargina. La estrategia de obtención en células de *P. pastoris* fue la secreción de dicha proteína como dos cadenas polipeptídicas.

### **6.5 Diseño y construcción de un sistema de expresión en *Pichia pastoris* para una producción escalable y económicamente rentable de insulina humana glargina**

#### **6.5.1 Diseño de la secuencia codificante de la insulina glargina y definición de la estrategia de clonación**

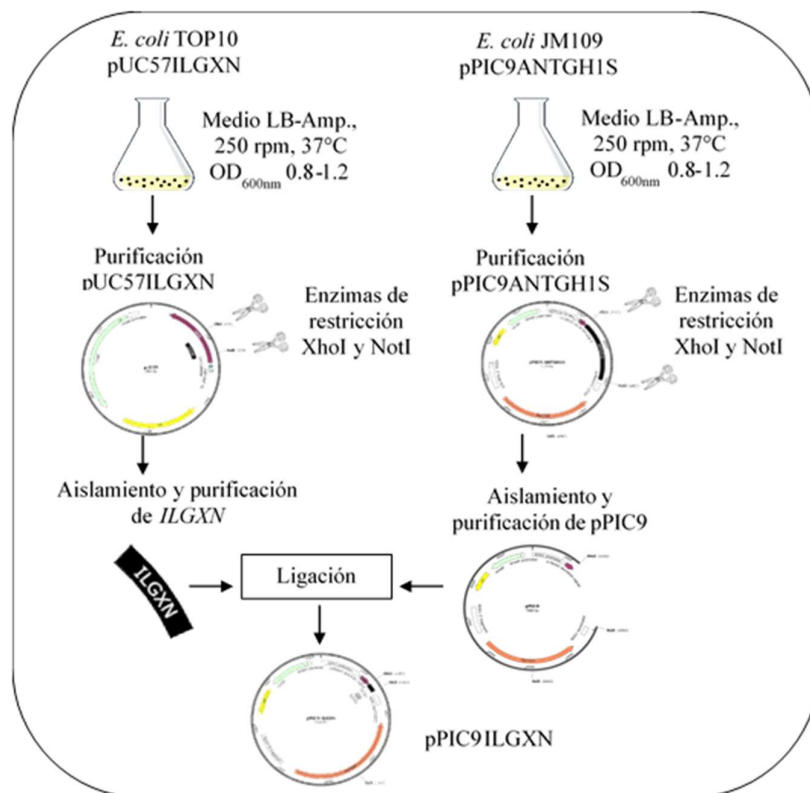
##### **6.5.1.1 Diseño de la secuencia codificante de la glargina**

Se definió la secuencia nucleotídica para el gen sintético que codificó para la proteína de interés. La secuencia de nucleótidos que codificó para el precursor de insulina glargina (*ILGXN*), y que contiene los sitios de restricción XhoI y NotI en sus extremos, se sintetizó y se insertó en el vector pUC57 en el sitio de restricción EcoRV; obteniéndose el vector pUC57ILGXN (Bio BASIC Inc., Markham, Ontario, Canadá). La secuencia de ácidos nucleicos de glargina se optimizó según codones preferenciales para la expresión en *P. pastoris* (Sreekrishna y Kropp, 1996).

##### **6.5.1.2 Estrategia de clonación**

La estrategia general del paso de clonación se muestra en la Figura 13. El plásmido pUC57ILGXN se purificó y se digirió con doble digestión enzimática con las enzimas de restricción XhoI y NotI. A partir de una electroforesis en gel de agarosa se aisló y se purificó el fragmento de interés, inserto *ILGXN*. De igual forma se realizó para el plásmido pPIC9ANTGH1S, pero en este caso el fragmento de interés fue el vector pPIC9.





**Figura 13.** Esquema de la estrategia general para la construcción del plásmido pPIC9ILGXN. El plásmido precursor pPIC9 y el fragmento *ILGXN* fueron liberados de los plásmidos pPIC9ANTGH1S y pUC57ILGXN, con las enzimas de restricción XhoI y NotI, respectivamente. Posterior al paso de ligación el vector resultante obtenido fue pPIC9ILGXN.

### 6.5.2 Construcción del plásmido pPIC9ILGXN

El plásmido pUC57ILGXN se re-suspendió según el siguiente procedimiento: el vial de 1.5 mL que contiene 4 µg del plásmido pUC57ILGXN (Bio BASIC Inc., Markham, Ontario, Canadá) se centrifugó a 1000 rpm (900 x g) por 5 min a 4°C. Luego se le añadió 40 µL de agua destilada estéril a 4°C y se re-suspendió suavemente con ayuda del vortex (se estimó una concentración inicial de 100 ng/µL, según datos del proveedor). En tres tubos estériles de 0.6 mL se realizaron dos alícuotas de 20 y 10 µL, respectivamente, y se calentaron a 65°C por 20 min. Los viales se almacenaron a -20°C hasta su uso. El producto pUC57ILGXN se recibió en el laboratorio con la información de un análisis de secuenciación nucleotídica (Sección 11.2).

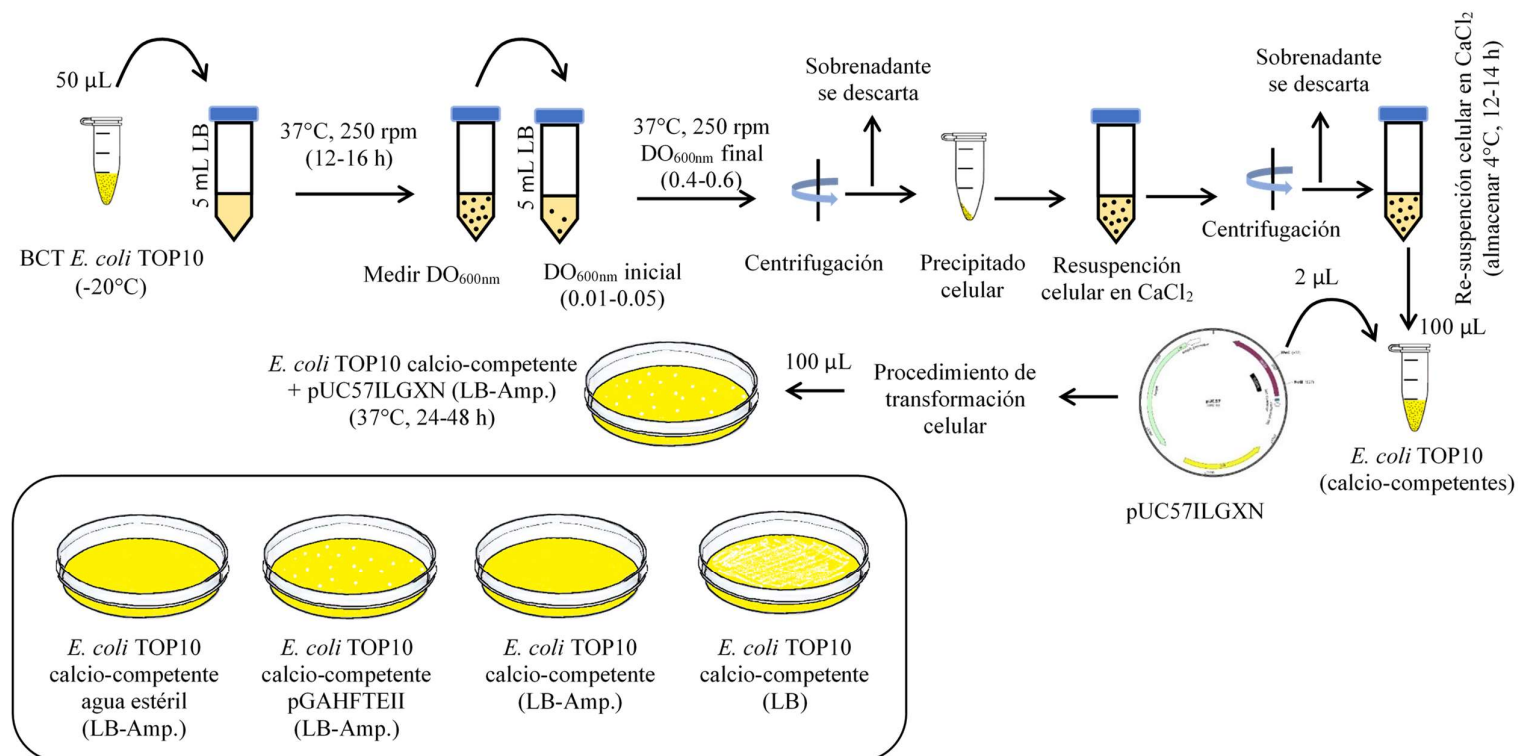
Para la preparación de las células de *E. coli* TOP10 calcio-competentes se tomaron muestras de las conservas en glicerol almacenadas a -20°C se activaron según el siguiente procedimiento: 50 µL de células se utilizaron para inocular 5 mL del medio de cultivo LB en un tubo de 15 mL. Las células se crecieron a 37°C y 250 rpm durante

12-16 h. Seguidamente, se midió la densidad celular y se volvió a inocular en 5 mL de medio de cultivo LB en un tubo de 15 mL a una  $DO_{600nm}$  inicial entre 0.01-0.05. El cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  final de 0.4-0.6. Las células se colectaron luego de una centrifugación a 10000 rpm (13000 x g) por 10 min a 4°C. El paquete celular se re-suspendió, suavemente con la ayuda de una micropipeta, en  $CaCl_2$  0.1 mol/L con un volumen correspondiente a la décima parte del volumen del cultivo celular en LB. El material se incubó por 10 min a 4°C. Posterior a una centrifugación de 10000 rpm (13000 x g) por 10 min a 4°C se recuperaron las células, las cuales fueron re-suspendidas en  $CaCl_2$  0.1 mol/L con la mitad del volumen de re-suspensión anteriormente usado.

Las células se almacenaron a 4°C durante 12-14 h antes de ser usadas en el paso de transformación celular. Nota: Para realizar dicho procedimiento la solución de  $CaCl_2$  se usó a 4°C.

Las células de *E. coli* TOP10 calcio-competentes se transformaron con el plásmido pUC57ILGXN que contiene el gen sintético *ILGXN* que codifica para el precursor de la insulina glargina, según el siguiente procedimiento: 100 µL de células *E. coli* TOP10 calcio-competentes y almacenadas a 4°C se añadieron en un vial de 2 mL, se adicionaron 2 µL del plásmido pUC57ILGXN, previamente re-suspendido. El material se incubó a 4°C durante 30 min. Posteriormente, se incubó a 42°C durante 30 s y seguidamente a 4°C por 2 min. Luego al vial se le añadió 1 mL de solución SOC previamente calentado a 37°C. A continuación, las células se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 1 h en el equipo Thermomixer R (Eppendorf International, NY, EE.UU.). De las células transformadas se tomaron 10 y 100 µL y se aplicaron en cajas Petri con medio sólido LB-Amp. (Figura 14). Las placas se colocaron en una incubadora estática a 37°C, hasta que se visualizaran las colonias transformadas (24-48 h). Luego que aparecieron las colonias, las cajas Petri se almacenaron a 4°C hasta su uso (Figura 14).

Para el control de viabilidad celular y control negativo del experimento se añadieron 100 µL de células *E. coli* TOP10 calcio-competentes en cajas Petri con medio sólido LB y LB-Amp., respectivamente. Para el control de la transformación se sembraron 10 y 100 µL de células *E. coli* TOP10 calcio-competentes transformadas con agua estéril (control negativo) y con el plásmido pGAHFETII (control positivo), en cajas Petri con medio sólido LB-Amp. (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema del procedimiento de transformación de las células de *E. coli* TOP10 calcio-competentes con el plásmido pUC57ILGXN. En el recuadro se representan los controles del experimento: Las células en cajas Petri en LB y LB-Amp. son los controles de viabilidad celular y negativo del ensayo, respectivamente. *E. coli* TOP10 pGAHFTEII en cajas Petri LB-Amp. es el control positivo del ensayo. Las células se extendieron con ayuda de un asa de extensión.

Para preparar el banco de células de trabajo (BCT) se seleccionaron dos colonias de células de *E. coli* TOP10 pUC 57ILGXN crecidas en cajas Petri con medio sólido de cultivo LB-Amp. se seleccionaron para inocular 5 mL de medio de cultivo LB-Amp. (caldo LB suplementado con Ampicilina a 100 µg/mL) en un tubo de 15 mL. El cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm durante 12-14 h. Seguidamente, se midió la densidad celular y se volvió a inocular 5 mL de medio de cultivo LB-Amp. en un tubo de 15 mL a una DO<sub>600nm</sub> inicial entre 0.01-0.05. El cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> final de 0.4-0.6 (4-6 h). Las células se colectaron luego de una centrifugación a 10000 rpm (13000 x g) por 10 min a 4°C, a partir de 1 mL del cultivo celular. El paquete celular se re-suspendió, suavemente con la ayuda de una micropipeta, en medio LB suplementado con glicerol al 50% (v/v) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para realizar la extracción y purificación a escala analítica del ADN plasmídico de las células de *E. coli* TOP10 pUC57ILGXN (a partir del BCT) y *E. coli* JM109 pPIC9ANTGH1S (Fuentes-Garibay *et al.*, 2015) se utilizó el método de lisis alcalina; según se describe a continuación: Las células de *E. coli* de los dos BCT almacenadas a -20°C se activaron según el siguiente procedimiento: 100 µL de células se utilizaron para inocular 5 mL del medio de cultivo LB en un tubo de 15 mL. Las células se crecieron a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar DO<sub>600nm</sub> final entre 1-2, durante 12-16 h. Las células (2 mL del medio de cultivo celular) se colectaron luego de una centrifugación a 14000 rpm (18620 x g) por 10 min a 4°C. El paquete celular se re-suspendió, suavemente con la ayuda de una micropipeta o vortex, en 200 µL de Sol. I y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Seguidamente se añadieron 400 µL de Sol. II (previamente a 37°C), la mezcla se agitó 4 veces por inversión y se incubó 5 min a 4°C. Posteriormente se añadieron 300 µL de Sol. III, la mezcla se agitó 4 veces por inversión y se incubó 5 min a 4°C. El material se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 10 min a 4°C. Se tomaron 700 µL del sobrenadante posterior a la centrifugación y se pasó a otro vial de 2 mL y se le añadió igual volumen de isopropanol (previamente a 4°C), la mezcla se agitó cuatro veces por inversión y se incubó 10 min a 4°C. El material se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 10 min a 4°C. El sobrenadante posterior a la centrifugación se descartó y al material precipitado se le añadieron 500 µL de ETOH al 70% y se re-suspendió con la ayuda del vortex. El material se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 5 min a 4°C. El sobrenadante

posterior a la centrifugación se descartó y el material precipitado (pastilla) se dejó desecar a temperatura ambiente entre 20-30 min. La pastilla obtenida se re-suspendió en 40-60  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril (libre de nucleasas), el vial se calentó a 65°C por 20 min. La siguiente tabla muestra los pasos para purificar el ADN plasmídico (Tabla 6). Posteriormente, a los viales que contienen el ADN plasmídico purificado (plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S) se les añadió 1-2  $\mu\text{L}$  de RNAasa (RNase ONE<sup>TM</sup> Ribonuclease, 10 U/ $\mu\text{L}$ , PROMEGA, EE.UU.) y se incubó 1 h a 37°C. Luego el vial se calentó a 65°C por 20 min y se almacenó a 4°C hasta su posterior uso y análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 6.** Secuencia de los pasos a seguir para la extracción y purificación del ADN plasmídico: Se usó el método de lisis alcalina de células de *E. coli* homogeneizadas a partir de muestra de cultivos celulares con volumen de 2 mL y 15 mL, respectivamente.

Pasos	Vial de 2 mL	Vial de 15 mL
1	Centrifugar 8000 rpm (6080 x g), 5 min, TA	Centrifugar 4500 rpm (3350 x g), 15 min, TA
2	Descartar el sobrenadante de centrifugación	Descartar el sobrenadante de centrifugación
3	Añadir 200 µL de Sol I al paquete celular	Añadir 1 mL de Sol I al paquete celular
4	Re-suspender el paquete celular con ayuda de la pipeta y/o vortex	Re-suspender el paquete celular con ayuda de la pipeta y/o vortex
5	Incubar en reposo 5 min a TA	Incubar en reposo 5 min a TA
6	Añadir 400 µL de Sol II, previamente a 37°C	Añadir 2 mL de Sol II, previamente a 37°C
7	Mezclar por inversión	Mezclar por inversión
8	Incubar 5 min a 4°C (agua/hielo)	Incubar 10 min a 4°C (agua/Hielo)
9	Añadir 300 µL de Sol III	Añadir 1.5 mL de Sol III
10	Mezclar por inversión	Mezclar por inversión
11	Incubar 10 min a 4°C (H <sub>2</sub> O/Hielo)	Incubar 15 min a 4°C (H <sub>2</sub> O/Hielo).
12		Centrifugar a 4500 rpm (3350 x g) 15 min, 4°C
13		Separar el sobrenadante a razón de 2 mL en viales de 2 mL
14	Centrifugar 14000 rpm (18620 x g), 10 min, 4°C	Centrifugar 14000 rpm (18620 x g), 10 min, 4°C
15	Transferir aproximadamente 700 µL del sobrenadante a otro vial de 1.5-2.0 mL	Transferir aproximadamente 700 µL del sobrenadante a otro vial de 1.5-2.0 mL
16	Añadir igual volumen de Isopropanol	Añadir igual volumen de Isopropanol
17	Mezclar por inversión	Mezclar por inversión
18	Incubar 10 min a TA	Incubar 10 min a TA
19	Centrifugar 14000 rpm (18620 x g), 10 min, 4°C	Centrifugar 14000 rpm (18620 x g), 10 min, 4°C
20	Descartar el sobrenadante	Descartar el sobrenadante
21	Añadir 500 µL de ETOH 70% al material insoluble (pastilla) posterior a la centrifugación. Re-suspender (vortex)	Añadir 500 µL de ETOH 70% al material insoluble (pastilla) posterior a la centrifugación. Re-suspender (vortex)
22	Centrifugar 14000 rpm (18620 x g), 10 min, 4°C	Centrifugar 14000 rpm (18620 x g), 15 min, 4°C
23	Descartar el sobrenadante	Descartar el sobrenadante
24	Desecar la pastilla a TA (20-30 min)	Desecar la pastilla a TA (20-30 min)

TA: temperatura ambiente

La caracterización de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S mediante digestión enzimática, con las enzimas de restricción XhoI y NotI, se realizó de la siguiente forma: Primero, se realizó un análisis “*in silico*” utilizando el programa computacional NEBcutter (New England Biolabs, MA, EE.UU., <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) para determinar los tamaños teóricos de los fragmentos que se deberían obtener al digerir ambos plásmidos con las enzimas de restricción XhoI y NotI (Tabla 7). Seguidamente, se realizó una digestión enzimática de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S se procesaron con doble digestión enzimática, con las enzimas XhoI y NotI (Tabla 8).

**Tabla 7.** Tamaños teóricos esperados para la caracterización de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S con las enzimas de restricción XhoI y NotI.

Plásmido	Tamaño (pb) luego de la digestión enzimática con la(s) enzimas de restricción XhoI y NotI		
	XhoI	NotI	XhoI y NotI
pUC57ILGXN	2892	2892	2717
			175
pPIC9ANTGH1S	9688	9688	7980
			1708

La mezcla de reacción para la digestión enzimática se incubó a 37°C durante 1 h, seguido de una inactivación mediante otra incubación a 65°C por 20 min. Posteriormente, para corroborar la presencia de los fragmentos de ADN esperados, una alícuota de 3 µL de la reacción enzimática fue analizada mediante un ensayo de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La solución de corrida utilizada fue TBE 1X y las bandas se tiñeron con GelRed Nucleic Acid Stain. Luego de corroborarse la caracterización de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S, el procedimiento se realizó a escala preparativa.

**Tabla 8.** Mezcla de la reacción de la digestión enzimática de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S, a escala analítica, con las enzimas de restricción XhoI y NotI.

Reactivo (concentración)	Control (XhoI o NotI) ( $\mu$ L)	Positivo XhoI ( $\mu$ L)	Positivo NotI ( $\mu$ L)	Positivo XhoI y NotI ( $\mu$ L)
Agua destilada estéril (libre de nucleasas)	20.5	19.5	19.5	18.5
Cut Smart buffer (10X)	2.5	2.5	2.5	2.5
pUC57ILGXN / pPIC9ANTGH1S	2	2	2	2
XhoI (20 U/ $\mu$ L)	0	1	0	1
NotI (100 U/ $\mu$ L)	0	0	1	1
Volumen total ( $\mu$ L)	25	25	25	25

El objetivo de purificar los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S y realizar la digestión con las enzimas de restricción XhoI y NotI a escala preparativa fue aislar y purificar mediante un gel de agarosa los fragmentos del inserto *ILGXN* y el vector pPIC9. Dichos fragmentos se ligaron y se construyó el plásmido pPIC9ILGXN, luego se transformaron las células de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> electro-competentes.

Las células de *E. coli* TOP10 pUC57ILGXN y *E. coli* JM109 pPIC9ANTGH1S de los respectivos BCT almacenadas a -20°C se cultivaron según el siguiente procedimiento, para cada una: 100  $\mu$ L de células se utilizaron para inocular 5 mL del medio de cultivo LB-Amp. en un tubo de 15 mL. Las células se crecieron a 37°C y 250 rpm durante 12-16 h. Seguidamente, se midió la densidad celular y se inocularon 20 mL de medio de cultivo LB-Amp. en un matraz de 250 mL, a una DO<sub>600nm</sub> inicial entre 0.01-0.05. El cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> final de 0.4-0.6 (4-6 h). Las células se colectaron luego de dos centrifugaciones sucesivas en dos tubos de 15 mL a 4500 rpm (3350 x g) por 15 min a 4°C. El paquete celular se re-suspendió, con la ayuda de una micropipeta o vortex, en 1 mL de Sol. I y se incubó a TA durante 5 min. Seguidamente se añadieron 2 mL de Sol. II (previamente a 37°C), la mezcla se agitó 4 veces por inversión y se incubaron 5 min a 4°C. Posteriormente se añadieron 1.5 mL de Sol. III, las mezclas se agitaron cuatro veces por inversión y se incubó 5 min a 4°C. El material se centrifugó a 4500 rpm (3350 x g) por 15 min a 4°C. Luego el sobrenadante se dispensó a razón de



un volumen de 2 mL en viales de 2 mL y se centrifugaron a 14000 rpm (18620 x g) por 10 min a 4°C. De cada vial se tomaron 700 µL del sobrenadante posterior a la centrifugación, se pasó a otro vial de 2 mL y se le añadió igual volumen de isopropanol (previamente a 4°C), la mezcla se agitó cuatro veces por inversión y se incubó 10 min a TA. El material se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 10 min a 4°C. El sobrenadante posterior a la centrifugación se descartó y al material precipitado se le añadieron 500 µL de ETOH a 70% y se lavó agitando con la ayuda del vortex. El material se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 5 min a 4°C. El sobrenadante posterior a la centrifugación se descartó y el material precipitado (pastilla) se dejó secar a temperatura ambiente entre 20-30 min (Tabla 6). Cada pastilla obtenida se re-suspendió en 40-60 µL de agua destilada estéril (libre de nucleasas) y los volúmenes se unieron en un solo vial de 2 mL, se calentó a 65°C por 20 min y luego se almacenó a 4°C. Posteriormente, se determinó la concentración del DNA plasmídico empleando un equipo nanofotómetro P-300 de Implen (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Munich, Alemania). Las muestras de ADN plasmídico fueron incubadas con RNase, como se describió previamente, teniendo en cuenta las correlaciones de cuantificación según el fabricante.

Las reacciones para el doble corte enzimático de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S con las enzimas de restricción XhoI y NotI se conformó según la Tabla 9.

**Tabla 9.** Mezcla de la reacción de la digestión enzimática de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S, a escala preparativa, con las enzimas de restricción XhoI y NotI.

Reactivo (concentración)	Positivo XhoI y NotI (μL)
Agua destilada estéril (libre de nucleasas)	16
Cut Smart buffer (10X)	5
pUC57ILGXN (240 ng/μL)	25
pPIC9ANTGH1S (330 ng/μL)	
XhoI (20 U/μL)	2
NotI (100 U/μL)	2
Volumen total (μL)	50

Se emplearon 6.0 y 8.3 μg de ADN plasmídico de pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S, respectivamente, en el paso de digestión enzimática. De forma independiente para cada producto de la digestión enzimática se procedió de la siguiente forma: La mezcla de las reacciones (Tabla 9) se incubó a 37°C por 1 h. Una alícuota de 2 μL se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a escala analítica, para corroborar la calidad del producto obtenido, posterior a la digestión enzimática.

El volumen restante de la reacción enzimática se aplicó en un gel de agarosa preparativo de electroforesis al 0.8%, como se describe a continuación: La cámara de electroforesis, molde para el gel, peine y separadores se sumergieron en SDS 0.1% durante 12-14 h. Luego se descartó dicha solución y los materiales se enjuagaron con abundante agua destilada estéril (libre de nucleasas). Una vez ensamblado el gel de agarosa en la cámara de electroforesis se aplicaron 25 μL del ADN plasmídico previamente purificado. Seguidamente se realizó la corrida electroforética (100 V, 60 mA). Nota: Las corridas de electroforesis se hicieron por separado para cada muestra.

Al finalizar la corrida electroforética el gel de agarosa se transfirió el gel sobre una película de parafilm fino y se colocó sobre el transluminador. La visualización e identificación de la banda de interés se realizó con la ayuda de la luz UV usando la intensidad baja del equipo transluminador y exponiendo el gel al menor tiempo posible de dicha radiación electromagnética. La banda de interés identificada se separó del gel de

agarosa con la ayuda de una navaja estéril. El fragmento del gel de agarosa que contiene la banda de interés se cortó en pequeños pedazos rectangulares y se depositaron dentro de un vial de 0.6 mL previamente preparado. Nota: La preparación del vial de 0.6 mL con algodón se realizó perforando la base del vial a una distancia de 3-4 mm de fondo con una aguja 21G1<sup>1/2</sup>. Seguidamente se introdujo un pedazo de algodón, teniendo la precaución de dejar un espacio libre para luego introducir el fragmento del gel de agarosa. Luego se esterilizó el vial preparado.

Una vez introducido el fragmento del gel de agarosa en el vial de 0.6 mL, previamente preparado y estéril, éste se almacenó a -20°C por no menos de 4-5 h. Posteriormente el vial de 0.6 mL se introdujo dentro de un vial de 2 mL y se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 10 min a 4°C. Al vial de 2.0 mL, que contiene el líquido colectado posterior a la centrifugación, se le añadió Sol. III a razón de la décima parte del volumen colectado y tres volúmenes de ETOH al 95% (previamente a 4°C). Nota: El ETOH debe de añadirse lentamente, escurriendo por las paredes del vial y cayendo sobre el líquido e inclinando el vial de 2 mL, para formar una segunda capa por encima de la solución. Luego se incubó 10 min a -20°C, se mezcló por inversión y se incubó 2 h a -20°C. La solución se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 15 min a 4°C. El sobrenadante posterior a la centrifugación se descartó y al material precipitado se le añadió 500 µL de ETOH al 70% y se re-suspendió con la ayuda del vortex. El material se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 5 min a 4°C. El sobrenadante posterior a la centrifugación se descartó y el material precipitado (pastilla) se dejó desecar a temperatura ambiente entre 20-30 min. La pastilla obtenida se re-suspendió en 30 µL de agua destilada estéril (libre de nucleasas). El volumen de los viales se unió y la mezcla se calentó a 65°C por 20 min y luego se almacenó a 4°C hasta su uso en el paso de ligación.

La concentración de los fragmentos de DNA purificados (*ILGXN* y pPIC9) se realizó mediante una estimación visual a partir de un gel de agarosa al 0.8% a escala analítica. Una muestra de 5 µL de cada plásmido se aplicó en una electroforesis en gel de agarosa y la intensidad de dichas bandas se comparó con la de la banda de 1 kb del marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder Promega (Madison, WI, USA). Al aplicar 1 µL de dicho marcador, la banda a la altura de 1000 pares de base representa un fragmento

de masa de 100 ng. De esta forma se estimó la concentración de los fragmentos de ADN purificados.

La ligación del inserto *ILGXN* y el vector pPIC9 se realizó teniendo en cuenta las estimaciones de las concentraciones realizadas previamente: Para *ILGXN* (175 pb) la estimación fue de 2 ng/μL y para pPIC9 (7980 pb) fue de 20 ng/μL. La mezcla de la reacción se conformó según una relación molar 3:1 (inserto:vector). La masa requerida para la reacción de ligación se calculó según la ecuación 1 (<http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>, acceso en febrero de 2021).

$$\frac{\text{masa del vector (ng)} \times \text{Tamaño del inserto (kb)}}{\text{Tamaño del vector (kb)}} \times R = \text{masa del inserto (ng)}$$

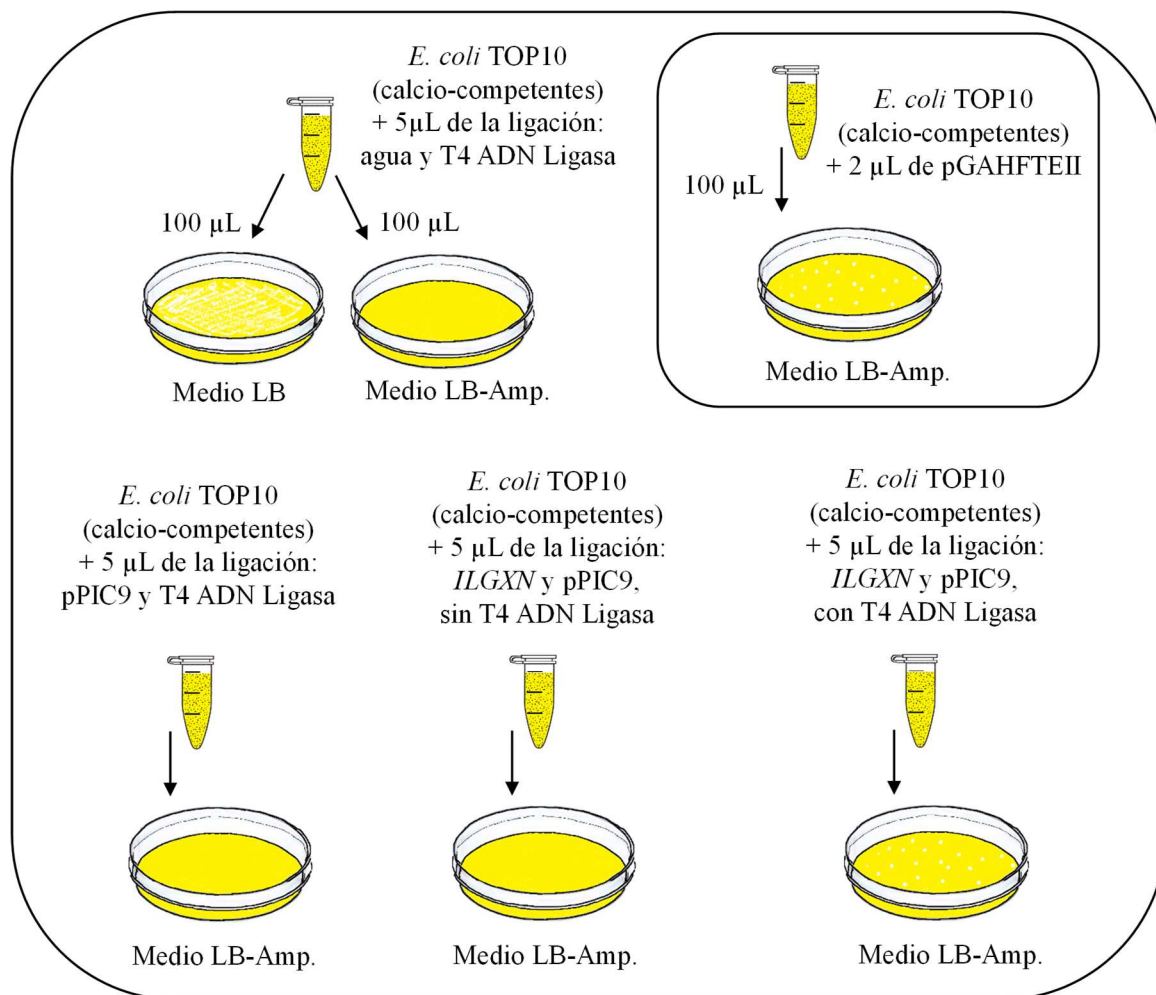
**Ecuación 1.** Cálculo de la cantidad del inserto *ILGXN* y el vector pPIC9 para realizar la ligación. Donde R: representa la relación molar (inserto:vector).

En nuestro caso, por ejemplo, para realizar la mezcla de reacción con R=3, 100 ng del vector pPIC9 y teniendo en cuenta el tamaño de los fragmentos, se calculó añadir a la mezcla 8.6 ng del inserto *ILGXN*. Para llevar a cabo el experimento, la mezcla se conformó a un volumen total de reacción de 15 μL (Tabla 10).

**Tabla 10.** Mezcla de reacción para realizar la ligación entre el inserto *ILGXN* y el vector pPIC9, con una relación molar 3:1 (inserto:vector).

Reactivo	Volumen (μL)
Agua destilada estéril (libre de nucleasas)	1.3
Solución tampón de ligación 10X (Tris-HCl 300 mM, MgCl <sub>2</sub> 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM, pH 7.8)	1.5
Fragmento ILGXN (2 ng/μL)	5.2
Vector pPIC9 (20 ng/μL)	6
T4 DNA Ligasa (3 U/μL) (10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% glicerol)	1
Volumen final de la mezcla para la ligación	15

La reacción de ligación se preparó en un vial de 200 μL. La mezcla se conformó según el orden descrito en la tabla anterior, se mezcló suavemente con la ayuda de la micropipeta y se incubó a TA por 3 h. Luego la reacción se inactivó por incubación a 65°C por 20 min. El vial se almacenó a 4°C hasta ser utilizado en el paso de transformación celular. Para los controles del experimento de ligación y transformación celular se conformaron otras reacciones como se muestra en la Figura 15. La ligación se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa aplicando 7 μL de las dos muestras de reacción donde se mezclaron los fragmentos de ADN a ligar (inserto y vector) con y sin T4 DNA ligasa. Seguidamente se procedió con el paso de transformación celular de *E. coli* TOP10. De los 15 μL de la reacción de ligación se tomaron 5 μL para transformar 50 μL de células de *E. coli* TOP10 calcio-competentes, siguiendo el procedimiento descrito previamente. Las células transformadas y sembradas en cajas Petri con medio sólido LB-Amp. (Figura 15) y se colocaron en una incubadora estática a 37°C hasta que se visualizaran colonias transformadas (24-48 h). Luego se realizó la caracterización del ADN plasmídico de las células de *E. coli* TOP10 pPIC9ILGXN.



**Figura 15.** Esquema de la ligación del inserto *ILGXN* y el vector pPIC9. Cada vial representa una reacción de ligación, excepto para la figura que se encuentra dentro del recuadro insertado (control positivo de la transformación). Para las tres reacciones que se encuentran en la parte baja de la figura: luego del paso de transformación, las células se colectaron posterior a una centrifugación a 8000 rpm (6080 x g) durante 5 min a 4°C, el sobrenadante se descarta y las células se re-suspendieron en 100 µL de medio SOC, y se aplicaron a las cajas Petri. Se utilizó agua destilada estéril (libre de nucleasas). Las células se extendieron con ayuda de un asa de extensión.

La caracterización del ADN plasmídico de *E. coli* TOP10 pPIC9ILGXN mediante digestión enzimática se realizó seguidamente, como se describe a continuación:

Las cinco cepas de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pPIC9ILGXN que crecieron en caja Petri con medio sólido LB-Amp., se utilizaron para inocular 5 mL de medio de cultivo LB-Amp. en tubos de 15 mL. Las células se crecieron a 37°C y 250 rpm durante 8 h. Seguidamente, se midió la densidad celular y se volvió a inocular en 5 mL de medio de cultivo LB-Amp. en tubos de 15 mL a una DO<sub>600nm</sub> inicial entre 0.01-0.05. El cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> final de 2-3. Con 500 µL de cada cultivo celular se realizó un BCT para conservar las células a -20°C, según el procedimiento descrito previamente. Las células se colectaron luego de una centrifugación a 14000 rpm (18620 x g) por 10 min a 4°C y se purificó el ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina, como se describió previamente. La confirmación de la ligación del fragmento *ILGXN* y el vector pPIC9, así como la transformación de las células de *E. coli* TOP-10 con el plásmido pPIC9ILGXN se confirmó mediante el siguiente procedimiento: Se realizó un análisis “*in silico*” utilizando el programa computacional NEBcutter (New England Biolabs, <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>, acceso en febrero de 2021) para determinar los tamaños teóricos de los fragmentos que se deberían obtener al cortar el plásmido pPIC9ILGXN con las enzimas de restricción XhoI y NotI (Tabla 11).

**Tabla 11.** Tamaños teóricos esperados para la caracterización del plásmido pPIC9ILGXN con las enzimas de restricción XhoI y NotI.

Plásmido	Tamaño (pb) luego de la digestión con la(s) enzimas de restricción		
	XhoI	NotI	XhoI y NotI
pPIC9ILGXN	8152	8152	7977
			175

Seguidamente se realizó el experimento de la digestión enzimática de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El plásmido pPIC9ILGXN fue digerido mediante una doble digestión enzimática. La Tabla 12 muestra los volúmenes de la mezcla de reacción utilizada para la digestión.

**Tabla 12.** Mezcla de las reacciones de digestión enzimática del plásmido pPIC9ILGXN con las enzimas de restricción XhoI y NotI.

Reactivo (concentración)	Control (XhoI o NotI) ( $\mu$ L)	Positivo XhoI ( $\mu$ L)	Positivo NotI ( $\mu$ L)	Positivo XhoI y NotI ( $\mu$ L)
Agua destilada estéril (libre de nucleasas)	20.5	19.5	19.5	18.5
Cut Smart buffer (10X)	2.5	2.5	2.5	2.5
pPIC9ILGXN (2490 ng/ $\mu$ L)	2	2	2	2
XhoI (20 U/ $\mu$ L)	0	1	0	1
NotI (100 U/ $\mu$ L)	0	0	1	1
Volumen total ( $\mu$ L)	25	25	25	25

La mezcla de reacción para la digestión enzimática se incubó a 37°C durante 1 h, seguido de una inactivación mediante otra incubación a 65°C por 20 min. Posteriormente, para corroborar la presencia de los fragmentos de ADN esperados, una alícuota de 3  $\mu$ L de la reacción enzimática fue analizada mediante un ensayo de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La solución de corrida utilizada fue TBE 1X y las bandas se tiñeron con GelRed Nucleic Acid Stain.



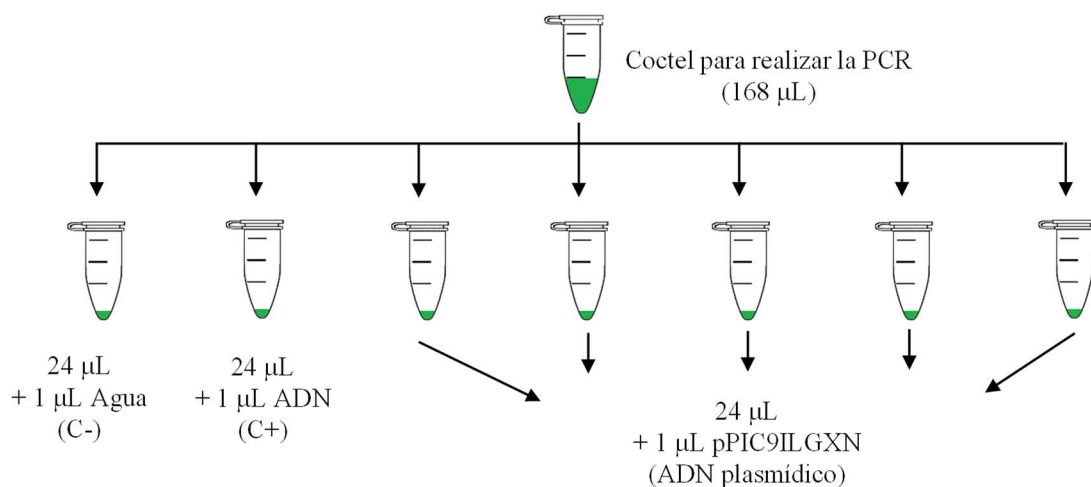
Para la caracterización mediante la técnica por PCR del plásmido pPIC9ILGXN, proveniente de *E. coli* TOP10, y el casete de expresión pPIC9ILGXN insertado al genoma de *P. pastoris* KM71; se utilizaron dos parejas de iniciadores u oligos: 5'AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') con 3'AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') (Manual *Pichia* expresión kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y el iniciador específico para la región *ILGXN* (3ILGXN: 5'-ACCTCTCTCACCACAAACCAA-3') con el 3'-AOX1. El protocolo estandarizado con la enzima *GoTaq* DNA polimerasa para conformar la mezcla de una reacción se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Volumen y concentración final, para una sola reacción, de los reactivos empleados en la PCR para caracterizar el ADN plasmídico y genómico de pPIC9ILGXN, según corresponda.

Reactivo	Concentración final	Volumen (μL)
Agua destilada estéril (libre de nucleasas)	-	13.3
Green Gotaq reaction Buffer (5X)	1X	5
Iniciador 5'AOX1 (5 μM)	0.5 μM	2.5
Iniciador 3'AOX1 (5 μM)	0.5 μM	2.5
Iniciador 3'ILGXN (5 μM)	0.5 μM	2.5
dNTP's (10 mM)	2 μM	0.5
GoTaq DNA Polimerasa (5 U/μL)	1 U	0.2
pPIC9ILGXN plasmídico o genómico		1
Volumen final		25 μL

Las cinco colonias de *E. coli* TOP10 pPIC9ILGXN obtenidas luego del paso de ligación y transformación se analizaron por PCR. La muestra del ADN plasmídico (pPIC9ILGXN purificado de las células de *E. coli* TOP10) se diluyó previamente 1:100 antes de ensamblar la reacción de la PCR.

Para hacer el experimento de la PCR se realizó un coctel con los reactivos descritos en la Tabla 13, con los siguientes volúmenes: 93.1  $\mu\text{L}$  de agua estéril (libre de nucleasas), 35  $\mu\text{L}$  de Green Gotaq reaction Buffer, 17.5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (según corresponda la pareja de iniciadores utilizada), 3.5  $\mu\text{L}$  de dNTP's, y 1.4  $\mu\text{L}$  de GoTaq DNA Polimerasa. De los 168  $\mu\text{L}$  del coctel se dispensaron 24  $\mu\text{L}$  en siete tubos y a cada uno de los tubos se le adicionó, en el siguiente orden, 1  $\mu\text{L}$  de: agua destilada estéril (libre de nucleasas) como control negativo (Figura 16).



**Figura 16.** Reacciones de la PCR para verificar la presencia del ADN plasmídico en las clonas de *E. coli* TOP10 pPIC9ILGXN.

Al finalizar la PCR se tomó una alícuota de 2  $\mu\text{L}$  de cada reacción y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA, teñidos con GelRed Nucleic Acid Stain. El programa que se empleó para la Amplificación de los fragmentos se muestra en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Condiciones del ensayo de la PCR para verificar la amplificación de la secuencia de ADN que codifica para el precursor de insulina glargina utilizando la GoTaq DNA polimerasa.

Etapas	Ciclos	Objetivo de la etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	Desnaturalización	94	2 min
1	30	Desnaturalización	94	1 min
		Hibridación	55	1 min
		Extensión	72	3 min
2	1	Extensión final	72	5 min
4	1	Almacenamiento 4°C		indefinido

### 6.5.3 Construcción de las cepas de *Pichia pastoris* portadoras de la secuencia codificante para ILGXN

Para transformar las células de *P. pastoris* KM71 por el método de electroporación se necesitó al menos 2 µg de ADN plasmídico pPIC9ILGXN. Por tanto, se realizó el procedimiento descrito en la sección anterior y Tabla 6 para obtener el plásmido pPIC9ILGXN a partir de las células de *E. coli* TOP10. Al vial que contiene el ADN plasmídico purificado (450 µL) se le añadió 3 µL de RNasa y se incubó 1 h a 37°C. Luego el vial se calentó a 65°C por 20 min y se almacenó a 4°C hasta su posterior análisis mediante electroforesis en gel de agarosa y su uso para transformar las células de *P. pastoris* KM71.

Todo el volumen de la preparación anterior se vertió, en volúmenes iguales, dentro de dos unidades filtrantes del sistema de filtración-concentración con rango de exclusión molecular de 3 kDa (Amicon 3 k ultra-0.5 mL centrifugal filter devices Cat. No. 42404, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y éste a su vez dentro del dispositivo colector de desechos. Seguidamente se añadieron 200 µL de agua destilada estéril (libre de nucleasas) y el dispositivo se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 5 min a 4°C. Este procedimiento de lavado se repitió tres veces y posteriormente se desechó el material permeado en el colector. El procedimiento se repitió una vez más. El producto se concentró hasta un volumen final de 100 µL. Luego, las unidades filtrantes se volvieron a

colocar, de forma invertida, dentro del dispositivo colector de desechos, ya vacío, y el sistema se centrifugó a 1000 rpm (900 x g) por 5 min a 4°C. Las dos muestras colectadas se unieron y se recuperó aproximadamente un volumen total de 200 µL. Posteriormente, se determinó la concentración del ADN plasmídico empleando un equipo nanofotómetro P-300 de Implen (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Munich, Alemania) y la muestra se incubó a 65°C por 20 min.

La reacción para la digestión enzimática de pPIC9ILGXN con la enzima de restricción Sall (Takara Bio Inc, Shiga, Japón) se realizó con 40 µL del concentrado obtenido de la preparación del ADN plasmídico (Tabla 15).

**Tabla 15.** Componentes y volúmenes de la mezcla para la reacción de la digestión enzimática de pPIC9ILGXN con Sall.

Reactivo	Volumen (µL)
Agua destilada estéril (libre de nucleasas)	3
Solución tampón H (5X)	5
Enzima Sall	2
pPIC9ILGXN (700 ng/mL)	40
Volumen total	50

La mezcla de la reacción se incubó a 1 h a 37°C, y posteriormente a 60°C por 20 min. La digestión enzimática se corroboró aplicando 2 µL del preparado de la reacción en una electroforesis a en gel de agarosa al 0.8%, en buffer TBE 1X teñido con GelRed Nucleic Acid Stain.

Confirmada la linealización del producto pPIC9ILGXN, el volumen restante de la digestión se colocó dentro de una unidad filtrante del sistema de filtración-concentración 3 kDa (Amicon 3 k ultra-0.5 mL centrifugal filter devices Cat. No. 42404, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y éste a su vez dentro del dispositivo colector de desechos. Seguidamente se añadieron 400 µL de agua destilada estéril (libre de nucleasas) y el dispositivo se centrifugó a 14000 rpm (18620 x g) por 5 min a 4°C. Este procedimiento de lavado se repitió tres veces y posteriormente el material permeado en el colector se

desechó. El producto se concentró hasta un volumen final de 100  $\mu$ L. Luego, la unidad filtrante se volvió a colocar, de forma invertida, dentro del dispositivo colector de desechos, ya vacío, y el sistema se centrifugó a 1000 rpm (900 x g) por 5 min a 4°C. El volumen recuperado se pasó a un vial de 200  $\mu$ L y el producto se concentró en un equipo concentrador a vacío de Labconco Co. Inc. (Kansas City, MO, EE.UU.), a una temperatura de 42°C y 1000 rpm (900 x g), hasta alcanzar un volumen final de 18  $\mu$ L.

Seguidamente, se determinó la concentración del ADN empleando un equipo nanofotómetro P-300 de Implen (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Munich, Alemania). La concentración del producto concentrado fue de 390 ng/ $\mu$ L. Una alícuota de 1  $\mu$ L del concentrado final y diluida 1:20 y se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, para corroborar la integridad del plásmido pPIC9ILGXN linealizado. La muestra concentrada se incubó a 65°C por 20 min y se almacenó a 4°C hasta su uso en la transformación de *P. pastoris* KM71.

Para realizar la transformación de las células de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup>, las células se prepararon según el siguiente procedimiento: una alícuota de 100  $\mu$ L del BCT con las células de *P. pastoris* KM71 almacenada a -20°C se usó para inocular 10 mL de medio de cultivo caldo YPD en un tubo de 50 mL. La muestra se incubó a 30°C durante 12-14 h y 250 rpm. A partir de las células reactivadas se inocularon 500 mL de medio de cultivo caldo YPD contenidos en un matraz de 2 L a una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0.1.

El cultivo se incubó a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> final de 0.6-1.0 (4-6 h). El cultivo se centrifugó a 4000 rpm (2500 x g) durante 10 min a 4°C en una centrífuga Beckman (Beckman Coulter Life Science, IN, EE.UU.). El sobrenadante de la centrifugación se descartó y las células se re-suspendieron en 100 mL de medio YPD suplementado con solución HEPES 20 mM (Research Organics Num. Cat. 9592H-100GR). Las células se añadieron a un matraz de 1 L y se le añadió 2.5 mL de DTT 1 M y se incubó a 30°C y 250 rpm durante 15 min. Seguidamente, se agregaron al matraz 400 mL de agua destilada estéril (previamente a 4°C). El cultivo se centrifugó a 4000 rpm (2500 x g) durante 10 min a 4°C en una centrífuga Beckman (Beckman Coulter Life Science, IN, EE.UU.). El sobrenadante de la centrifugación se descartó y las células se re-suspendieron en 250 mL con agua destilada estéril (previamente a 4°C). Las células lavadas se centrifugaron a 4000 rpm (2500 x g) durante 10 min a 4°C en una centrífuga

Beckman (Beckman Coulter Life Science, IN, EE.UU.). Estos dos últimos pasos de lavado y centrifugación se realizaron dos veces. Finalmente, las células se re-suspendieron en 20 mL de Sorbitol 1 M estéril previamente a 4°C. El producto se centrifugó a 4000 rpm (2500 x g) durante 10 min a 4°C. El sobrenadante de la centrifugación se descartó y las células se re-suspendieron en 1 mL con Sorbitol 1 M estéril (previamente a 4°C). Se realizaron alícuotas de las células a razón de 40 µL por vial de 2 mL. Las muestras de *P. pastoris* electro-competentes obtenidas se envolvieron en varias capas de papel secante y se almacenaron a una temperatura de -70°C, hasta su uso.

Previo a comenzar la transformación celular de *P. pastoris*, la celda de electroporación de 2 mm (Bio-Rad GenePulser Cuvette, Num. Cat. 1652086, NY, EE.UU.) fue incubada a 4°C en agua/hielo. La transformación de las células *P. pastoris* KM71 electro-competentes se realizó utilizando el sistema de electroporación Gene Pulser® II Electroporation System (Bio-Rad, NY, EE.UU.). El procedimiento se realizó como se describe a continuación: Las células electro-competentes se descongelaron lentamente a 4°C. Luego, en condiciones de esterilidad (bajo flujo laminar) se le añadieron 5 µL (2 µg) el ADN plasmídico pPIC9ILGXN linealizado y preparado como se indicó anteriormente. La mezcla de las células y el plásmido pPIC9ILGXN se añadieron en la celda de electroporación (previamente a 4°C) en condiciones de esterilidad (bajo flujo laminar). La celda se colocó cuidadosamente sobre el tren de carga del dispositivo “Controller pulser” y se corrió hacia los electrodos. El dispositivo se conectó a la fuente eléctrica del sistema de electroporación. Seguidamente se ajustaron los parámetros, resistencia (400 Ohm), capacitancia (25 µF), voltaje (1500 Volt), campo de fuerza (7500 kV/cm), tiempo del pulso de la descarga eléctrica (5 ms). Posteriormente se realizó la descarga eléctrica. La celda se retiró cuidadosamente, se colocó en hielo y en condiciones de esterilidad (bajo flujo laminar) se añadió 1 mL de Sorbitol 1 M estéril (previamente a 4°C). La mezcla se homogenizó por inversión de 5-10 veces.

Alícuotas de 200, 300 y 500 µL de las células electroporadas y 100 µL de *P. pastoris* KM71 (control) electro-competentes se sembraron en cajas Petri con medio sólido RBD His<sup>-</sup>. Adicionalmente, 10 µL de las células electroporadas se sembraron en cajas Petri conteniendo medio sólido YPD. Las células se extendieron en las cajas Petri con la ayuda

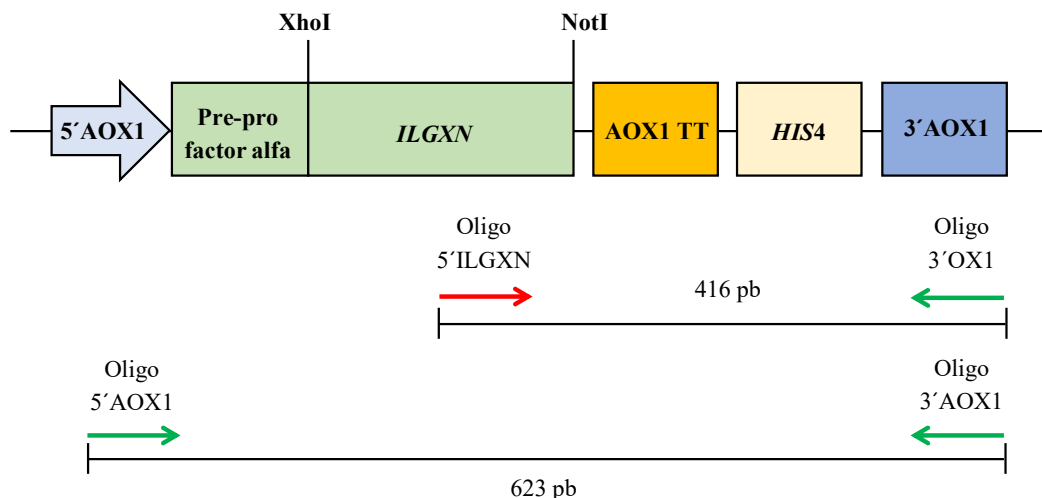
de un asa de extensión. Las cajas Petri se colocaron en una incubadora estática a 37°C hasta que se visualizaran las colonias (aproximadamente 96-120 h).

#### **6.5.4 Caracterización genotípica de las cepas recombinantes *Pichia pastoris***

##### **KM71ILGXN**

La caracterización de las colonias de *P. pastoris* KM71 transformadas con el plásmido pPIC9ILGXN se realizó mediante la determinación de la integración del gen heterólogo en el genoma de cada una de las cepas recombinantes seleccionadas, mediante la técnica de PCR descrita en la sección 6.5.2.

En este ensayo de PCR se emplearon dos parejas de iniciadores: una pareja que hibridó en la región del promotor (5' AOX1) y el terminador de la transcripción (3' AOX1), que da como resultado un producto amplificado de 623 pb; y la otra pareja de iniciadores hibridó en la región específica de *ILGXN* (5' ILGXN) y el terminador de la transcripción (3' AOX1), que da como resultado un producto amplificado de 4126 pb (Figura 17).



**Figura 17.** Representación gráfica de una región del plásmido pPIC9ILGXN. Se representan los sitios de hibridación de los iniciadores 5'AOX1, 3'AOX1 y del iniciador específico 5'ILGXN; así como el tamaño de los fragmentos de ADN que se amplificaron mediante el ensayo de la PCR. Las secuencias de los oligos utilizado fueron:

Oligo 5'AOX1: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

Oligo 3'AOX1: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Oligo específico 3ILGXN: 5'-ACCTCTCTCACCACAAACCAA-3'

De las dos cajas Petri que se sembraron con 200 y 300  $\mu$ L con *P. pastoris* KM71 transformadas con el plásmido linealizado pPIC9ILGXN se seleccionaron un total de 80 clonas recombinantes de *P. pastoris* KM71ILGXN. De cada caja Petri se seleccionaron, al azar, diez clonas y se inocularon en 10 mL de medio YPD en tubos de 50 mL. Las células se incubaron a 30°C con 250 rpm durante 16-20 h. Una alícuota de 10  $\mu$ L se añadió en un vial de 200  $\mu$ L y se le adicionó 1  $\mu$ L de Liticasa (5 U/ $\mu$ L). La muestra se incubó 10 min a 30°C. De la mezcla anterior se tomó 1  $\mu$ L, previamente diluido 1:10 con agua destilada estéril, para adicionar a la reacción de la PCR descrito en la Tabla 13 y Figura 16. El programa que se empleó para la Amplificación de los fragmentos se muestra en la Tabla 14. De esta forma se corroboró la integración del gen heterólogo pPIC9ILGXN en el genoma

Por otra parte, las 80 clonas de *P. pastoris* KM71ILGXN seleccionadas se inocularon en 10 mL de medio YPD en tubos de 50 mL. El cultivo se incubó a 30°C con 250 rpm durante 16-20 h. Las células (1 mL del cultivo celular) se colectaron luego de una centrifugación a 14000 rpm (18620 x g) por 5 min a TA. El paquete celular se re-suspendió en 500  $\mu$ L de medio YPD suplementado con glicerol al 15% (v/v) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. De esta forma se conformó este BCT.



## **6.5.5 Caracterización fenotípica de las cepas recombinantes *Pichia pastoris* KM71ILGXN**

### **6.5.5.1 Cultivos en matraz agitado a 96 h de inducción**

El cultivo celular en condiciones de inducción hasta 96 h se realizó en tres fases:

1) Fase de activación: 50  $\mu$ L de células de un transformante His<sup>+</sup> del BCT almacenada a -20°C se utilizaron para inocular 10 mL de medio de cultivo YPD en tubos de 50 mL. El cultivo se colocó dentro de una incubadora con agitación Environ Shaker Lab-Line (LAB-LINE, MA, EE.UU.) a 30°C con 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> final de 8-10, durante 16-20 h (Tabla 16).

2) Fase de crecimiento: Las células reactivadas en YPD se utilizaron para inocular 100 mL del medio de cultivo en BMG en matraces de 1 L. El cultivo se ajustó a una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0.3 y se incubó a 30°C con 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> final de 6-8, durante 12-14 h (Tabla 16).

3) Fase de inducción: Las células obtenidas del cultivo en medio BMG se recuperaron posterior a dos centrifugaciones sucesivas en un tubo de 50 mL, a 4000 rpm (2500 x g), 15 min y TA. El sobrenadante de la centrifugación se descartó y las células se re-suspendieron en 25 mL de medio de cultivo BMM. Seguidamente se midió la DO<sub>600nm</sub> y, en caso necesario, se ajustó la OD<sub>600</sub> inicial a 20 con BMM en un volumen de 25 mL. Luego al cultivo se le añadió MeOH al 0.75% (v/v). Se realizó otra incubación a 30°C, con agitación continua a 250 rpm, durante 96. Se añadió metanol a una concentración final de 0.75% (v/v) cada 12 h (Tabla 16).

**Tabla 16.** Etapas de los cultivos celulares y condiciones experimentales en la inducción de *Pichia pastoris* KM71ILGXN.

Etapas		
Fase de activación	Fase de crecimiento	Fase de inducción
- 50 $\mu$ L del BCT para inocular 10 mL YPD  - 30°C, 250 rpm, 16-20 h	- 100 mL BMG (Solución tampón fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$ , glicerol 1%)  - DO <sub>600nm</sub> inicial: 0.3  - DO <sub>600nm</sub> final: 6-8  - 30°C, 250 rpm	- 25 mL BMM (Solución tampón fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$ ) suplementado con MeOH 0.75% (v/v) cada 12 h  - DO <sub>600nm</sub> inicial: 20  - 96/48 h cultivo en inducción  - 30°C, 250 rpm

El sobrenadante del cultivo se recuperó por centrifugación en tubos de 50 mL a 4000 rpm (2500 x g), 10 min, 4°C) para el posterior análisis por diferentes técnicas analíticas.

#### 6.5.5.2 Determinación de concentración de proteínas totales (Método de Bradford)

Para la determinación de la concentración de proteínas totales extracelulares se utilizaron los sobrenadantes de cultivos en BMM inducidos con MeOH de los cultivos de *P. pastoris* KM71ILGXN (sección 6.5.6). Un mililitro de sobrenadante de cultivo libre de células se aplicó a una columna de filtración en gel Sephadex G25 (M), columna PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA) y la fracción de interés eluida de la columna se colectó en solución tampón acetato de sodio 100 mM pH 3.6. La concentración de proteínas totales se determinó midiendo la absorbancia a 595 nm en un NanoPhotometer® Pearl (NanoPhotometer Pearl, Impln GmbH, Munich, Alemania) que se presentó por la formación de un complejo azul entre las proteínas y el reactivo azul brillante de Coomassie G-250. Los valores de absorbancias se correlacionaron con una curva estándar de concentración de BSA en el intervalo de 0-45  $\mu$ g/mL (Bradford, 1976), como se muestra en la Tabla 17.

El procedimiento fue el siguiente: Se pesaron 5 mg de BSA en un matraz de aforación de 5 mL y se aforó con agua destilada estéril, para obtener una concentración final de 1 mg/mL. Se dispensaron 250  $\mu$ L de la anterior solución en un matraz de aforación de 5 mL y se aforó con agua destilada estéril, para obtener una concentración final de 50  $\mu$ g/mL. Adicionalmente, 10 mg del reactivo azul brillante de Coomassie G-250 se disolvieron en 5 mL de etanol al 95% y se agitó vigorosamente. Luego se adicionaron 10 mL de ácido fosfórico al 85%. La mezcla se agitó por 30 min y se llevó a un volumen final de 100 mL con agua destilada estéril y se volvió a agitar durante 30 min. La solución se filtró con papel de filtro cualitativo de grado 1 (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA), para eliminar restos del colorante no disuelto.

La curva de calibración se realizó por triplicado. La mezcla de un volumen determinado de solución de BSA (50  $\mu$ g/mL), agua destilada y 800  $\mu$ L de solución del reactivo azul brillante de Coomassie G-250 (Tabla 17) se agitó con ayuda del vortex. Luego se determinó el valor de la absorbancia para cada muestra. Los valores de las absorbancias se utilizaron para conformar la recta de calibración según el método de los mínimos cuadrados, realizando un gráfico de valores de absorbancia a 595 nm en función de la concentración ( $\mu$ g/mL) de los estándares empleados, con ayuda del programa Microsoft Excel. Para el caso de las muestras problema (sobrenadante de cultivo celular libre de células), la mezcla compuesta por 200  $\mu$ L de muestra y 800  $\mu$ L de solución del reactivo azul brillante de Coomassie G-250 se agitó con ayuda del vortex y se le determinó la absorbancia. El cálculo del valor de concentración de proteínas totales de las muestras problemas se determinó mediante una interpolación matemática del valor de absorbancia obtenido en la recta de calibración con BSA, para esto se tuvo en cuenta el factor de dilución.

**Tabla 17.** Mezcla de reacción para conformar la curva de calibración utilizado en el método de Bradford.

Curva estándar ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABS (50 $\mu\text{g/mL}$ ) ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )
Blanco para la medición de la absorbancia	0	200
5.0	20	180
7.5	30	170
15.0	60	140
22.5	90	110
30.0	120	80
45.0	180	20

### 6.5.5.3 Análisis de proteínas por SDS-PAGE

Para los ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se emplearon geles al 16%. Los geles se prepararon en tres partes: un gel tapón, que sirve de soporte al gel separador (segunda parte) que luego se añade una vez gelificado el tapón y la tercera parte es el gel concentrador, que es al que se le coloca el peine como molde de los pozos para la aplicación de las muestras. La composición de los geles se muestra en las siguientes tablas.

**Tabla 18.** Volúmenes y concentración final de los reactivos empleados para la preparación del gel separador de la SDS-PAGE.

Solución “stock”	Gel separador (16%)	
	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Agua destilada	2050	--
Tris-HCl 2 M, pH 8.0	1500	0.375 M
SDS 10%	80	0.10%
Acrilamida/bis-acrilamida (30%) *	4250	--
TEMED	10	0.125%
PSA (10%)	50	0.0625%

\* Acrilamida 28.5%, N,N'-metilen-bis-acrilamida 1.5% (Relación 19:1).

**Tabla 19.** Volúmenes y concentración final de los reactivos empleados para la preparación del gel concentrador de la SDS-PAGE.

Solución stock	Gel concentrador	
	Volumen (μL)	Concentración final
Agua destilada	3050	-
Tris-HCl 2 M, pH 6.9	250	0.12 M
SDS 10%	40	0.10%
Acrilamida/bis-acrilamida (30%)*	300	-
TEMED	10	0.125%
PSA (10%)	40	0.075%

\* Acrilamida 28.5%, N,N'-metilen-bis-acrilamida 1.5% (Relación 19:1).

Las muestras del sobrenadante de cultivo libre de células (sección 6.5.5.1) se prepararon de la siguiente forma: un volumen de 1 mL del sobrenadante de cultivo se aplicó a una columna de filtración en gel PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, EE. UU.) y la fracción eluida se colectó en solución tampón acetato de sodio 100 mM (pH 3.6). Posteriormente la muestra se concentró 50 veces en un concentrador Centrivap (Labconco, Kansas City, MO, EE. UU.). Las muestras concentradas se diluyeron 1:2 con “buffer sample 2X” y un volumen total no mayor a 15 μL.

Una vez aplicada las muestras en los pozos del gel concentrador, la cámara de electroforesis se conectó a la fuente de poder y entonces se ajustó una corriente inicial de 15 mA. Las muestras comenzaron a migrar dentro del gel concentrador y se mantuvo esa corriente inicial hasta que el marcador de la corrida electroforética (colorante azul) llegó a penetrar en el gel separador. En ese momento se aumentó la corriente hasta 25 mA y la corrida siguió hasta que el colorante azul penetrara, por completo, en el gel tapón. Todas las corridas de SDS-PAGE se realizaron dentro de una cámara refrigerada a temperatura 6-8°C.

Al culminar la corrida electroforética se desensambló el molde del gel de poliacrilamida. El gel se sumergió en un recipiente de plástico que contenía solución fijadora (Sección 11.1) y se mantuvo con movimiento en un balancín agitador durante al menos 1 h. La solución fijadora se descartó y se añadió la solución de tinción

(Sección 11.1), el gel se mantuvo en un balancín agitador durante al menos 5 h. Luego se descartó la solución de tinción y el gel se enjuagó con agua destilada, y se añadió la solución decolorante (Sección 11.1). El gel permaneció en esta solución hasta que se visualizaron un contraste adecuado entre las bandas azules de proteínas y el resto del gel con un color claro. Luego se tomaron las fotos.

La estimación del peso molecular del precursor de insulina glargina se realizó a través de un gráfico estándar entre el peso molecular (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular de rango ultra bajo (Ultra-low Range Molecular Weight Marker (MW 1060-26600), Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) en función de la distancia de migración en unidades arbitrarias (U.A) recorrida en el gel de poliacrilamida, por cada banda. Luego se estimó una curva de tendencia lineal y se obtuvo una ecuación, según el método de los mínimos cuadrado. A partir del gráfico se realizó una interpolación de la distancia de migración recorrida en el gel de la proteína recombinante y se estimó la masa molecular.

#### **6.5.5.4 Análisis de proteínas por RP-HPLC**

Las muestras de insulina glargina recombinante obtenida del sobrenadante de cultivo libres de células de los cultivos en matraz de agitación, cultivos del biorreactor, así como la fracción eluída de la cromatografía de intercambio catiónico se analizaron mediante RP-HPLC.

Las muestras previamente desaladas en una columna PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA) equilibrada con ácido fosfórico al 0.1% (pH 2.0), se inyectaron en el sistema de HPLC (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EE.UU.) equipado con un detector de UV a 220 nm. Se usó una columna cromatográfica de fase reversa Ultrasphere C8 (4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, 300 Å). El gradiente de elución con fase móvil A (0.1% ácido trifluoroacético (TFA) en agua) y fase móvil B (0.05% TFA en acetonitrilo) fue el siguiente: 0 a 5 min, 10% B; 5 a 32 min, 10 a 46% B; 32 a 35 min, 46% B; 35 a 36 min, 46 a 50% B; 36 a 40 min, 50 a 100% B; 40 a 47 min, 100% B; 47 a 52 min, 100 a 10 % B; 52 a 60 min, 10% B. El flujo volumétrico fue de 1 mL/min y la columna se mantuvo a 45°C durante toda la corrida.

La cuantificación del producto recombinante se realizó mediante la interpolación del área bajo la curva del pico identificado como glargina de una cadena de la muestra en una recta de calibración obtenida de las áreas bajo la curva de los diferentes picos de

estándares de glargina de una cadena purificada a diferentes concentraciones. La concentración de los estándares de la insulina glargina purificada fue determinada mediante el kit de ensayo de proteína de ácido bicinonínico de Pierce (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). También se utilizó insulina glargina comercial como referencia del tiempo de retención.

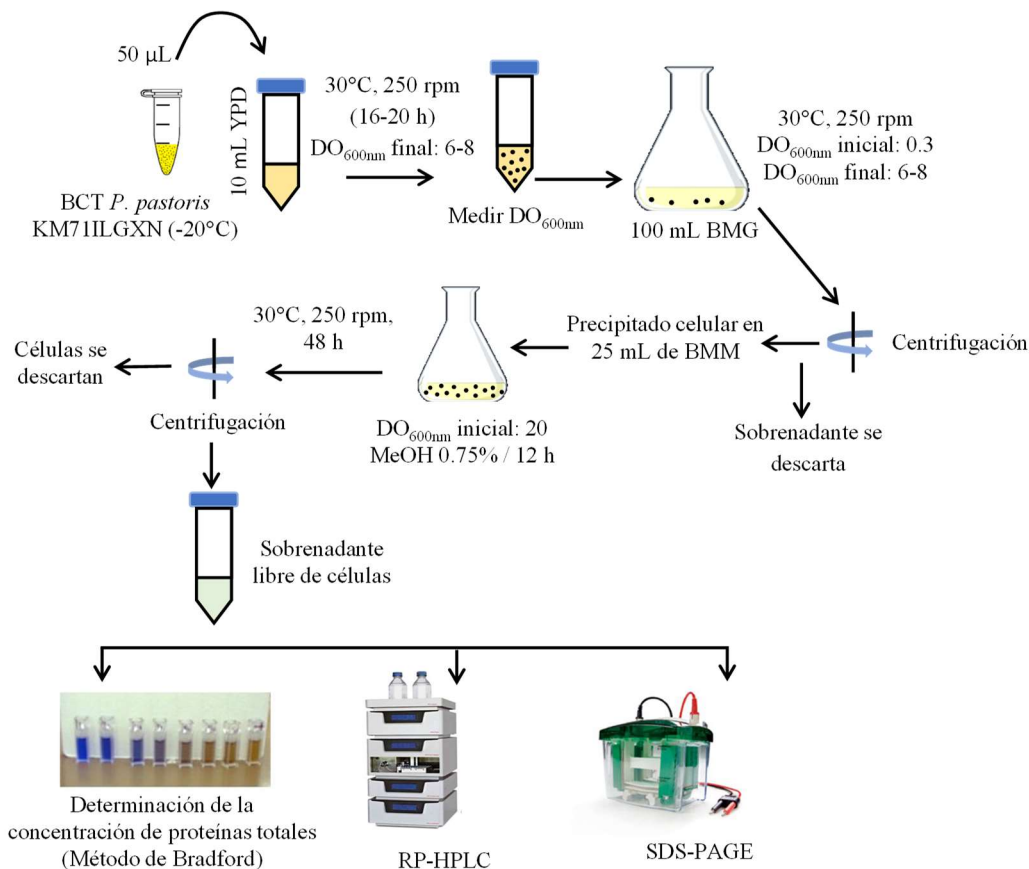
#### **6.5.5.5 Análisis mediante espectrometría de masas**

El análisis de espectrometría de masas (MS) se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La proteína recombinante se produjo en un cultivo en matraz agitado. El sobrenadante de cultivo libre de células se purificó mediante cromatografía de intercambio catiónico (sección 6.7) y RP-HPLC (sección 6.5.5.4), el producto obtenido se secó en un concentrador Centrivap (Labconco, Kansas City, MO, EE. UU.). Luego se disolvió en ácido fórmico al 1% (v/v), se desaló y concentró en un ZipTip C18 (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) utilizando agua:acetonitrilo (97:3)/ácido fórmico al 0.1% (v/v). La muestra se analizó en un sistema nanoACQUITY UPLC acoplado en línea con el espectrómetro de masas de alta definición SYNAPT G2-S (Waters, Milford, MA, EE.UU.) Utilizando ionización por electro pulverización. Los datos se analizaron con el software MassLynx V4.1 (Waters, Milford, MA, EE. UU.). También se analizó la insulina glargina comercial como referencia. La masa molecular teórica para la glargina de cadena simple y de cadena doble se calculó a partir de su secuencia de aminoácidos utilizando la herramienta ProtParam disponible en el servidor ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>, acceso en febrero de 2021). Se tuvieron en cuenta los tres enlaces disulfuro.

#### **6.5.6 Cultivos en matraz agitado y selección de la cepa sobre-productora**

Los cultivos celulares en condiciones de inducción a 48 h se realizaron según se refiere en la sección 6.5.5.1 y Tabla 16. Se analizaron 80 transformantes de *P. pastoris* (clonas de *P. pastoris* KM71ILGXN) seleccionadas al azar y se evaluó la OD<sub>600nm</sub> inicial y final. Transcurrido el tiempo de inducción, el cultivo celular se centrifugó en tubos de 50 mL a 4000 rpm (2500 x g), 10 min y 4°C. El sobrenadante de cultivo libre de células se almacenó a -20°C hasta el posterior análisis por diferentes técnicas analíticas (Figura 18).



**Figura. 18.** Metodología desarrollada para la selección de las cepas de *Pichia pastoris* KM71ILGXN productoras del precursor de insulina glargina. Las 16 clonas analizadas por RP-HPLC fueron seleccionadas como baja, media y altos valores de rendimiento proteínas total extracelular/biomasa.

Esta metodología de cultivo se utilizó para la selección de la cepa sobre-productora del precursor de insulina glargina, teniendo en cuenta el valor normalizado con respecto al máximo valor del rendimiento de proteínas extracelular/biomasa. Las cepas que produjeron un rendimiento normalizado de proteína/biomasa superior al 90% se consideraron las cepas sobre-productoras. La concentración de proteínas total se determinó por el método de Bradford (sección 6.5.5.2). Los valores de la densidad celular (Biomasa), en unidades de medida de g/L, se estimaron en base a 1.0 unidad de DO<sub>600nm</sub> que corresponde aproximadamente a 0.23 g de peso seco de células (DCW), o sea multiplicar el valor de la DO<sub>600nm</sub> por el factor 0.2.

De esta forma se seleccionaron las cepas de *P. pastoris* KM71ILGXN con mayor rendimiento para los experimentos siguientes.



### 6.5.7 Cinéticas de crecimiento comparativas en condiciones de inducción del gen heterólogo

Las cinéticas de crecimiento en matraz con agitación constante se realizaron empleando las cepas KM71ILGXN Col.#77 (C), KM71ILGXN Col.#9, KM71ILGXN Col.#48 y pPIC9ANTGH1S (control del ensayo).

Para realizar los cultivos celulares en condiciones de inducción se reactivaron las células: 50 µL de células del BCT almacenadas a -20°C se utilizaron para inocular 5 mL de medio de cultivo YPD en tubos de 15 mL. Los cultivos se colocaron dentro de una incubadora con agitación Environ Shaker Lab-Line (LAB-LINE, MA, EE.UU.) a 30°C con 250 rpm durante 12-14 h. Las células reactivadas en YPD se utilizaron para inocular 10 mL de medio de cultivo YPD en tubos de 50 mL a una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0.3. Los cultivos se colocaron dentro de una incubadora con agitación a 30°C con 250 rpm hasta que alcanzaran una DO<sub>600nm</sub> final de 1.5-2.0. Este cultivo se utilizó para inocular 25 mL del medio de cultivo en BMG en matraces de 250 mL a una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0.3 y se incubaron a 30°C con 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> final de 1.4.

Para tener un control mejor de la DO<sub>600nm</sub> final para el segundo cultivo en YPD, así como en BMG se realizaron experimentos previos para obtener una expresión matemática promedio del crecimiento celular. En ambos casos la ecuación del crecimiento se ajustó a una curva exponencial (Ecuación 2).

$$OD_{600nm} \text{ final} = OD_{600nm} \text{ inicial} * e^{Xt}$$

**Ecuación 2.** Ecuación que describe el crecimiento exponencial de las células de *Pichia pastoris* en medios de cultivo YPD y BMG. t es el tiempo del cultivo y X representa una constante de valor 0.204 y 0.310 para los cultivos en YPD y BMG, respectivamente.

La ecuación 2 se obtuvo a partir de una cinética de crecimiento de las cuatro cepas evaluadas en el estudio de inducción del gen heterólogo. Las condiciones de los cultivos en YPD y BMG se realizó como se describió previamente. Se tomaron muestras de 500 µL del cultivo celular cada 2 h para medir la DO<sub>600nm</sub>, hasta culminar el cultivo a las 12 h. Los cultivos se realizaron por duplicado. Para cada cepa se realizó un gráfico de la DO<sub>600nm</sub> en función del tiempo. Los puntos de la curva se ajustaron según una línea de tendencia exponencial, similar a como lo muestra la expresión matemática de la ecuación 2. En todos

los casos el valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) fue superior a 0.99. De esta forma se obtuvo el valor constante representado por “X” en cada ecuación obtenida, representando el valor de la pendiente cuando se realiza un gráfico semilogarítmico. Los valores de la constante “X” se promediaron para cada medio de cultivo utilizado.

Una vez obtenidas las células del cultivo en medio BMG, según el experimento de inducción, recuperadas posterior a una centrifugación en tubos de 50 mL a 4000 rpm (2500 x g), 15 min y temperatura ambiente. El sobrenadante de la centrifugación se descartó y las células se re-suspendieron en medio de cultivo BM y se ajustó la  $DO_{600nm}$  inicial a 1.0 para un volumen final de 25 mL. Luego se le añadió el MeOH a una concentración final de 0.75% (v/v). Los cultivos se incubaron a 30°C con 250 rpm. La cinética de los cultivos se realizó tomando muestra cada 2 h para determinar la biomasa celular por el método de turbidimetría (medición de la  $OD_{600nm}$ ).

Para calcular las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) se construyeron graficas semilogarítmicas de  $DO_{600nm}$  vs. tiempo, corregida por el factor de dilución. Se determinaron las pendientes de dichas curvas de crecimiento en la fase exponencial mediante el método de mínimos cuadrados. Las pendientes de cada curva correspondieron a los valores de cada velocidad específica de crecimiento en unidades de medida de  $h^{-1}$ . Para calcular los tiempos de duplicación (TD) se utilizó la siguiente ecuación (Ecuación 3).

$$TD = \ln(2)/\mu$$

**Ecuación 3.** Cálculo del tiempo de duplicación para las cepas de *Pichia pastoris* evaluadas condiciones de inducción del gen heterólogo.  $\mu$ : velocidad específica de crecimiento.

## **6.6 Diseño e implementación de un proceso para la producción escalable y económicamente rentable de la insulina glargina con el sistema de expresión de *Pichia pastoris* construido**

### **6.6.1 Estrategia de cultivos en biorreactor de 7 L**

Todos los cultivos se llevaron a cabo en un biorreactor de 7 L, interconectado con el biocontrolador ez-Control y el programa BioXpert (Applikon Biotechnology BV, Schiedam, Holanda). El inóculo se preparó en 2 L de medio BMG, como se describe en (Viader-Salvadó *et al.*, 2013).

Se realizaron un total de tres cultivos en tres etapas (lote de glicerol, lote alimentado con glicerol y lote alimentado con metanol) para evaluar el efecto de dos estrategias de alimentación de metanol (cultivos MLFB y MNLFB) y dos temperaturas (28°C y 24°C), en la etapa de lote alimentado con MeOH sobre los parámetros de crecimiento celular y producción. El crecimiento celular se determinó por duplicado a partir del DCW de las células recolectadas en alícuotas de 2 mL de medio de cultivo, basado en que 1 g de células húmedas es aproximadamente igual a 0.25 g de células secas. La tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) para la etapa de lote alimentado con metanol, en la estrategia MNLFB, se determinó a partir de la pendiente de regresión lineal del logaritmo natural del DCW frente al tiempo de inducción. En cada punto de muestreo, el volumen del caldo de cultivo se estimó a partir de la suma del volumen de caldo de cultivo inicial, el volumen de solución de hidróxido de amonio, solución de glicerol y metanol añadidos hasta ese momento, menos el volumen muestreado en el momento de la toma de muestra anterior. La concentración del precursor de insulina glargina en el medio de cultivo libre de células se determinó mediante RP-HPLC (sesión 6.5.5.4).

La producción total del precursor de insulina glargina se calculó utilizando el volumen del medio de cultivo libre de células, que se estimó con el volumen de células por célula seca ( $3.56 \times 10^{-3}$  L/g de células secas) como se describió previamente (Katakura *et al.*, 1998). Para los tres cultivos, el volumen de metanol añadido por la bomba de alimentación de metanol se consideró como el volumen de consumo de metanol.

Para todos los cultivos, la velocidad del flujo de aire y la agitación se establecieron en 5 L/min (1.2-2.5 vvm) y 1500 rpm, respectivamente, y se mantuvo manualmente una presión en el sistema de de 120 cm H<sub>2</sub>O. En las tres etapas, el pH del medio de cultivo se

mantuvo constante a pH 5.0 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28%, que también se utilizó como fuente de nitrógeno. En la etapa por lotes alimentado con MeOH, el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 25% de saturación con la suplementación de mezclas de oxígeno y aire según fuera necesario.

Durante todo el cultivo celular se tomaron muestras a diferentes tiempos (8 mL de muestra de cultivo en cada colecta). El volumen de las muestras se alicuotó en dos viales de 2 mL previamente tarados. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm (13000 x g) por 10 min a 4°C, el sobrenadante de cultivo posterior a la centrifugación se almacenó a -20°C hasta ser analizado. Los tubos que contenían el material insoluble (células) se pesaron para determinar el peso húmedo (DCW).

### **6.6.2 Generación de inóculos para cultivos en biorreactor**

Con el objetivo de obtener muestras de inóculo con una alta concentración celular se realizó un cultivo inicial. El medio de cultivo salino con 50% de glicerol (un volumen total de 1800 mL) se añadió al vaso del fermentador y se le adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de antiespumante 289 (Sigma-Aldrich Co. EE.UU.). El vaso del fermentador se esterilizó y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Seguidamente, el vaso del fermentador se instaló en sistema del fermentador y se le añadió 8.8 mL de PTM1 al medio bajo condiciones de esterilidad con ayuda de un mechero. Luego se ajustaron las condiciones de la fermentación: velocidad del flujo de aire 5 L/min (1.2-2.5 vvm), agitación de 1500 rpm, presión a la salida del vaso del fermentador se mantuvo manualmente a 25 cm  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 5.0 mantenida con una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28% y temperatura a 30°C.

Las células para el inóculo se obtuvieron de la siguiente forma: 50  $\mu\text{L}$  de células (cepa *P. pastoris* KM71ILGXN Col.#77 (C)) del BCT almacenada a -20°C se utilizaron para inocular 10 mL de medio de cultivo YPD en un tubo de 50 mL. El cultivo se colocó dentro de una incubadora con agitación Environ Shaker Lab-Line (LAB-LINE, MA, EE.UU.) a 30°C con 250 rpm hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  final de 8-10, durante 16-20 h. Las células reactivadas en YPD se utilizaron para inocular 200 mL del medio de cultivo en BMG en un matraz de 2 L. El cultivo se ajustó a una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  inicial de 0.3 y se incubó a 30°C con 250 rpm hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  final de 20-25. Los 200 mL del cultivo se utilizaron para inocular el fermentador.

A partir de las 16 horas de cultivo celular en el biorreactor se tomaron muestras cada 1:30-2:00 h (8 mL de muestra de cultivo en cada colecta) para calcular la densidad celular, como se describió previamente. El cultivo se detuvo cuando se alcanzó una OD<sub>600nm</sub> de 16.9, aproximadamente 20-21 h. Una vez terminado el cultivo, éste se centrifugó en tubos de 250 mL en una centrífuga Beckman (Beckman Coulter Life Science, IN, EE.UU.) y el material soluble posterior a la centrifugación se descartó. Las células recogidas en la fracción insoluble posterior a la centrifugación se re-suspendieron, bajo condiciones de esterilidad (flujo laminar), en 180 mL de solución BMG suplementado con 15% de glicerol. Luego se realizaron alícuotas de 13 mL en viales de 15 mL. La DO<sub>600nm</sub> estimada fue de 195-200. Estos viales, que conformaron las muestras de inóculos para las fermentaciones bajo condiciones de inducción con MeOH, se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para verificar la viabilidad de los inóculos almacenados a -20°C, se llevó a cabo una cuenta de células viables a partir de una de las alícuotas de inóculo mediante el método de dilución y siembra. Se realizaron diluciones sucesivas ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^8$ ) en buffer de fosfatos 1 M pH 6.0. De las diluciones  $10^6$  y  $10^8$  se tomaron 50 y 100 µL y se inocularon en cajas Petri con medio YPD agar. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h. Para el conteo de células viables, de las dos diluciones sembradas se seleccionó aquella que presentó el mayor número de colonias y que estuvieran lo suficientemente separadas para poder contarlas con facilidad. El número de UFC/mL se calculó multiplicando el número de colonias contadas en la placa por el factor de dilución entre el volumen del inóculo (20 µL).

### **6.6.3 Cultivo en lote en glicerol**

El inóculo generado de acuerdo con la sección 6.6.2 se reactivó de la siguiente forma: una alícuota de 13 mL del inóculo se utilizó para inocular 190 mL de medio de sales basales (FBS) y glicerol en un Erlenmeyer de 1 L. El cultivo se colocó dentro de una incubadora con agitación Environ Shaker Lab-Line (LAB-LINE, MA, EE.UU.) a 30°C con 250 rpm durante 4-5 h. El cultivo reactivado se empleó para inocular el medio de cultivo en el fermentador para la etapa en lote con glicerol.

La etapa por lotes de glicerol se llevó a cabo como se describió previamente (Viader-Salvadó *et al.*, 2013). El vaso del biorreactor, con 1.8 L de medio solución tampón con

sales basales (FBS) y glicerol, se esterilizó en una autoclave. Después, el vaso se instaló al sistema de fermentación. La temperatura en el medio de cultivo se ajustó a 30°C, la aeración a 5 L/min (1.2-2.5 vvm) y el pH a 5.0 ajustado con una solución de NH<sub>4</sub>OH al 28%, agitación de 1500 rpm, presión a la salida a 25 cm H<sub>2</sub>O. Antes de proceder a la inoculación, se añadieron al medio de cultivo 8.8 mL de biotina 500X (0.02% concentración final), 8.8 mL de PTM1 y 250 µL de antiespumante 289 (Sigma-Aldrich Co. EE.UU.) bajo condiciones de esterilidad con ayuda de un mechero. El medio de cultivo se inoculó con aproximadamente 200 mL de un inóculo reactivado. Esta etapa del cultivo se llevó a cabo hasta que se agotó la fuente de carbono (glicerol) que fue evidenciado por un aumento brusco del valor del oxígeno disuelto en el medio de cultivo (aproximadamente 22-24 h). Una vez terminada esta etapa se continuó el cultivo durante 45 minutos sin fuente de carbono, antes de proceder a la etapa de lote alimentado con glicerol.

#### **6.6.4 Cultivo de lote alimentado con glicerol**

La etapa en lote alimentado con glicerol se llevó a cabo con una tasa de alimentación exponencial de 50% (p/v) de glicerol (12 mL/L 0.02% de biotina y PTM1) (Zhang W, 2007), utilizando una bomba de alimentación programable (Masterflex L/S DIGISTALTIC Dispensing System, Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, EE.UU.) para generar una  $\mu$  constante de 0.062 h<sup>-1</sup> hasta alcanzar una concentración de DCW de 50 g DCW/L (aproximadamente 7 h). Seguido de un período de 45 minutos de inanición. Esta etapa se llevó a cabo a una temperatura de 30°C, pH 5.0 ajustado con una solución de NH<sub>4</sub>OH al 28%, la aeración a 5 L/min (1.2-2.5 vvm), una agitación de 1500 rpm, presión a la salida del vaso del fermentador se mantuvo a 25 cm H<sub>2</sub>O.

#### **6.6.5 Cultivo en lote alimentado con metanol**

La etapa de lote alimentado con metanol en la estrategia MLFB se llevó a cabo a 28°C alimentando con metanol al 100%, con 12 mL/L de biotina al 0.02% y PTM1, a una tasa que aumentó exponencialmente como se describió anteriormente (Barrigón, 2013), utilizando una bomba de alimentación programable (Masterflex, EE.UU.) para generar un valor constante  $\mu$  de 0.003 h<sup>-1</sup>. Para la estrategia MNLFB, se alimentó con metanol al 100%, 12 mL/L de biotina al 0.02% y PTM1. Se utilizó un sistema de control de circuito cerrado con un controlador y monitor de concentración de metanol de gases de escape

MC-168 (PTI Instruments, Kathleen, GA, EE.UU.) y el software NB208 (PTI Instruments, Kathleen, GA, EE.UU.) Se usó la bomba de alimentación programable Masterflex para mantener una concentración constante de metanol en el medio de cultivo de 1.0 g/L. La etapa por lote alimentado con metanol se inició con la alimentación de 5 mL de metanol al 100%, con 12 mL/L de biotina al 0.02% y PTM1, a un flujo constante durante 30 min. La temperatura se mantuvo a 28°C para el cultivo con MLFB y para los cultivos con MNLFB fue de 28°C y 24°C. En los tres cultivos, el paso por lotes alimentado con metanol duró al menos 75 h. Esta etapa la temperatura se ajustó según el experimento, el pH a 5.0 ajustado con una solución de NH<sub>4</sub>OH al 28%, la aeración a 5 L/min (1.2-2.5 vvm), una agitación de 1500 rpm, presión a la salida del vaso del fermentador se mantuvo manualmente a 25 cm H<sub>2</sub>O y el oxígeno disuelto fue mantenido arriba del 25% suplementando con mezclas de oxígeno-aire según fuera necesario.

## **6.6.6 Determinación de parámetros fisiológicos de los cultivos en biorreactor**

### **6.6.6.1 Determinación de crecimiento celular**

La biomasa en el cultivo se determinó a través de su densidad celular (DC) y DO<sub>600nm</sub>. De las muestras tomadas a diferentes tiempos (8 mL de muestra de cultivo en cada colecta) se alicuotaron 2 mL en dos viales de igual volumen previamente tarados y se centrifugaron a 14000 rpm (18620 x g) por 10 min a 4°C.

El material soluble se dispensó en otro vial de 2 mL y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis. Los viales que contenían el material insoluble (células) posterior a la centrifugación se pesaron. La densidad celular se calculó por la diferencia de peso entre el vial de 2 mL tarado y el vial con células, según la siguiente expresión (Ecuación 4).

$$DC = (1000 * (\text{peso vial células} - \text{peso vial tarado}))/8$$

**Ecuación 4.** Calculo para obtener la densidad celular (g/L) para los cultivos de *Pichia pastoris* KM71ILGXN en el biorreactor. La determinación experimental se realizó por duplicado. El factor 8 proviene del volumen de cultivo muestreado (2 mL) y que 1 g de células húmedas son aproximadamente 4 g de células secas. El factor 1000 proviene de la conversión de mL a L.

A partir del valor de la DC se calculó la biomasa en gramos de células secas a cada tiempo usando la siguiente ecuación (Ecuación 5).

$$X = DC \cdot V / 1000$$

**Ecuación 5.** Cálculo de la biomasa en gramos de células secas para los cultivos de *P. pastoris* KM711LGXN en el biorreactor. Donde X es la biomasa (g) al tiempo t, generalmente desde el inicio de la etapa de lote alimentado. DC es la densidad celular (g/L de células secas). V es el volumen de cultivo del biorreactor (mL) al tiempo t, generalmente desde el inicio de la etapa de lote alimentado. El factor 1000 proviene de la conversión de mL a L.

#### 6.6.6.2 Velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en la etapa de inducción con metanol se calculó a partir del gráfico del peso seco total de células en gramos (densidad celular x volumen del cultivo) vs. el tiempo de inducción en horas. Los datos se ajustaron a una ecuación exponencial, según:

$$y = a \cdot e^{bx}$$

**Ecuación 6.** Ecuación exponencial (DC vs. t) utilizada para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Donde y: es la biomasa (g), x: es el tiempo (h), b: es el promedio de la velocidad específica de crecimiento y a: es una constante.

Nota: Para cada punto analizado, se estimó el volumen del cultivo a partir de la suma del volumen inicial, los volúmenes añadidos de hidróxido de amonio, glicerol y metanol al tiempo analizado, menos el volumen de cultivo muestreado. La ecuación se debe de aceptar si se cumple que  $R^2 > 0.90$ . Nota: se pueden eliminar valores iniciales para mejorar el ajuste exponencial.

#### 6.6.6.3 Determinación de rendimiento celular proveniente del metanol ( $Y_{x/s}$ )

Para calcular el rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{x/s}$ ) se graficó la biomasa a cada tiempo ( $X_t$ ) vs. sustrato consumido o añadido a cada tiempo ( $S_t$ ) y ajustar la ecuación a una recta, según:

$$y = mx + b$$

**Ecuación 7.** Ecuación lineal ( $X_t$  vs.  $S_t$ ) utilizada para calcular el rendimiento biomasa/sustrato (g/g). Donde y: es la Biomasa a un cierto tiempo,  $X_t$  (g), x: sustrato consumido a un cierto tiempo,  $S_t$  (g).

La ecuación se debe de aceptar si se cumple que  $R^2 > 0.90$ . El rendimiento  $Y_{x/s}$  promedio es la pendiente de la recta (m). O sea,  $Y_{x/s} = m$



#### 6.6.6.4 Determinación de rendimiento de producción extracelular de insulina glargina/biomasa ( $Y_{p/x}$ )

Para calcular el rendimiento producto/biomasa ( $Y_{p/x}$ ) se graficó el producto a cada tiempo ( $P_t$ ) vs. biomasa a cada tiempo ( $X_t$ ). En nuestro caso el producto es el precursor de insulina glargina. Ajustar la ecuación a una recta, según:

$$y=mx+b$$

**Ecuación 8.** Ecuación lineal ( $P_t$  vs.  $X_t$ ) utilizada para calcular el rendimiento producto/biomasa (mg/g). Donde y: es el precursor de insulina glargina a un cierto tiempo en unidades de medida de miligramos (mg), x: es la biomasa a un cierto tiempo,  $X_t$  (g).

La ecuación se debe de aceptar si se cumple que  $R^2 > 0.90$ . El rendimiento  $Y_{p/x}$  promedio es la pendiente de la recta (m). O sea,  $Y_{p/x} = m$

#### 6.6.6.5 Determinación de rendimiento de producción extracelular de insulina glargina proveniente de metanol ( $Y_{p/s}$ )

Para calcular el rendimiento producto/sustrato ( $Y_{p/s}$ ) se grafica el producto a cada tiempo ( $P_t$ ) vs. sustrato a cada tiempo ( $S_t$ ). En nuestro caso el producto es el precursor de insulina glargina. Ajustar la ecuación a una recta, según:

$$y=mx+b$$

**Ecuación 9.** Ecuación lineal ( $P_t$  vs.  $S_t$ ) utilizada para calcular el rendimiento producto/sustrato (mg/g). Donde y: es el precursor de insulina glargina a un cierto tiempo en unidades de medida de miligramos (mg), x: es el sustrato a un cierto tiempo,  $S_t$  (g).

La ecuación se debe de aceptar si se cumple que  $R^2 > 0.90$ . El rendimiento  $Y_{p/s}$  promedio es la pendiente de la recta (m). O sea,  $Y_{p/s} = m$

#### 6.6.6.6 Velocidad específica de producción del precursor de insulina o productividad específica

Si asumimos que la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el rendimiento producto/biomasa ( $Y_{p/x}$ ) son valores constantes, entonces se calcula la productividad específica ( $q_p$ ) promedio como:

$$q_p = \mu * Y_{p/x}$$

**Ecuación 10.** Cálculo de la velocidad específica de producción del precursor de insulina glargina. Las unidades de medida son  $mg\ g^{-1}\ h^{-1}$ .

#### 6.6.6.7 Velocidad específica de consumo de sustrato

Si asumimos que la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{x/s}$ ) son valores constantes, entonces se calcula la velocidad específica (o consumo) de sustrato ( $q_s$ ) promedio como:

$$q_s = \mu / Y_{x/s}$$

**Ecuación 11.** Cálculo de la velocidad específica de sustrato. Las unidades de medida son  $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ .

### 6.7 Purificación y caracterización del producto recombinante de insulina glargina

Se realizó un cambio de tampón del medio de cultivo libre de células (8 mL) del cultivo de MNLFB (75 h de inducción y 24°C) a solución tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 3.6, (tampón A) usando la matriz Sephadex G-25 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, EE. UU.). Se realizó un paso de purificación adicional utilizando un sistema de cromatografía LP Biologic (Bio-Rad, Hercules, CA), una columna de intercambio catiónico HiTrap SP FF de 1 mL (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, EE. UU.), y un gradiente escalonado para la elución (20 mL del tampón A; 9 mL del tampón A suplementado con 250 mM de NaCl; 7.5 mL de acetato de sodio 100 mM, pH 5.6; y 8 mL de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). La corrida cromatográfica se realizó con un flujo volumétrico de 1 mL/min y la detección se realizó a 280 nm.

### 6.8 Niveles de expresión del gen *KEX2*

Los niveles relativos de expresión del gen *KEX2* para las células de los cultivos de MNLFB se determinaron mediante RT-qPCR utilizando el sistema termociclador Mx3005P QPCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) y dos genes normalizadores (*G6PD* e *YPT1*). Un total de tres pares de cebadores específicos (5qKEX2: 5'-GCCACTTTTTCGTCTTCCTCT-3', 3qKEX2:5'-GAAGTCTCTTTTACATCCGTTTCC-3', 5qYPT1:5'-GCGGTCAAGCTAGTGCTTCT-3', 3qYPT1:5'-TGCTGACAAAACGTAAAACCA-3', 5qG6PD: 5'-TTAAGAACCA-3', 5qG6PD: 5'-TTAAGGCCAGGT-3' de acuerdo con las secuencias de nucleótidos reportadas en GenBank (GenBank no. de acceso XM\_002491154.1, XM\_002491158.1 y XM\_002493580.1 para los genes *KEX2*, *G6PD* e

YPT1, respectivamente) y usando el software Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>, acceso en febrero de 2021). La especificidad de los oligonucleótidos diseñados se verificó con la herramienta blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acceso en febrero de 2021). Todos los cebadores se diseñaron para hibridar con la secuencia codificante (CDS) de cada secuencia de genes.

Se tomaron muestras de células en cuatro tiempos de inducción (0, 21, 47 y 68 h) y se almacenaron en el reactivo RNAlater (Ambion, Grand Island, NY, EE.UU.). Posteriormente, se lisaron 50 mg de células húmedas con perlas de vidrio y se extrajo el ARN total utilizando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI, EE. UU.). La calidad del ARN obtenido se evaluó mediante la relación de absorbancia de 260 a 280 nm (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Munich, Alemania), mediante electroforesis en gel de agarosa y número de integridad del ARN (RIN) utilizando el Bioanizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). La síntesis de cADN se realizó a partir de 150 ng de ARN total utilizando el kit de síntesis de ADNc de temperatura múltiple AffinityScript (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y oligo (dT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada cADN específico de cada transcrito de cada muestra se amplificó por duplicado con los cebadores específicos diseñados usando la mezcla qPCR SybrMaster (Jena Bioscience GmbH, Jena, Alemania) en un volumen de reacción de 20 µL. Se utilizó un programa de amplificación de 40 ciclos con dos pasos (95°C durante 20 s y 60°C durante 20 s), con un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min. Además, para asegurar la especificidad de los cebadores, se determinó la curva de disociación del producto amplificado al final de la amplificación, realizando un ciclo de tres pasos de 95°C y 1 min, 55°C durante 30 s y 95°C durante 20 s.

Los niveles de expresión relativa del gen *KEX2* se calcularon para cada cultivo mediante el método de cuantificación relativa (Pfaffl, M. W. 2001) con corrección de la eficiencia de la PCR y utilizando las muestras celulares del inicio de la etapa de inducción como muestras de calibración. Los niveles de expresión de los genes normalizadores se promediaron entre ellos utilizando la media geométrica. Se promediaron los niveles de expresión del gen *KEX2* en los tres tiempos de inducción para cada cultivo utilizando la media aritmética. Los valores de los niveles de expresión de *KEX2* se compararon estadísticamente usando una prueba t-Student para muestras independientes con un nivel

de significancia de 0.05 para evaluar el efecto sobre los niveles de expresión del gen *KEX2* de las dos temperaturas (28 y 24°C) en la etapa de inducción de los dos cultivos donde se utilizó la estrategia MNLFB.

### **6.9 Modelos moleculares computacional para la insulina glargina monocatenaria**

Los modelos moleculares de monómeros, homo-dímeros y homo-hexámeros para el precursor de insulina glargina se construyeron mediante modelaje por homología utilizando el servidor SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) con la estructura de la molécula de insulina unida el péptido B29-A1 monocatenaria (código PDB: 6INS) de *Sus. scrofa* como plantilla para los modelos de monómero y homodímero o la estructura de insulina Asp B28 (código PDB: 1ZEI) de *S. scrofa* como plantilla para el modelo de homo-hexámero.

El porcentaje de identidad de secuencia entre la insulina glargina monocatenaria y la secuencia 6INS o 1ZEI se calculó mediante alineamientos por pares globales de Needleman-Wunsch utilizando las herramientas blast. Los modelos moleculares se visualizaron utilizando el software UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) y el programa Swiss-PdbViewer/DeepView 4.1 (Guex y Peitsch, 1997), que también se utilizó para estimar la accesibilidad de los sitios Kex2. El análisis topológico para el monómero y el análisis de interacción entre los residuos de las dos cadenas para el homo-dímero y el homo-hexámero se realizaron con PDBsum (Laskowski *et al.*, 2018).

### **6.10 Análisis estadístico**

El análisis de la cinética de crecimiento y selección de la cepa sobre-productora se realizó con el programa “Statgraphics Centurion XVI.II”, para una sola variable: densidad celular, concentración de proteínas totales y rendimiento proteína extracelular/biomasa. Se analizó el cumplimiento de una distribución normal para cada uno de los valores de datos según prueba de hipótesis. Se calcularon los valores del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

El procesamiento de datos para el cálculo de velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación, así como la construcción de las gráficas de las cinéticas de crecimiento se realizó con el programa Microsoft Excel Office. Las cinéticas de crecimiento se realizaron seis veces para cada cepa. Los seis valores de velocidades

específicas de crecimiento y tiempos de duplicación se promediaron y se calcularon la desviación estándar y los coeficientes de variación en cada caso.

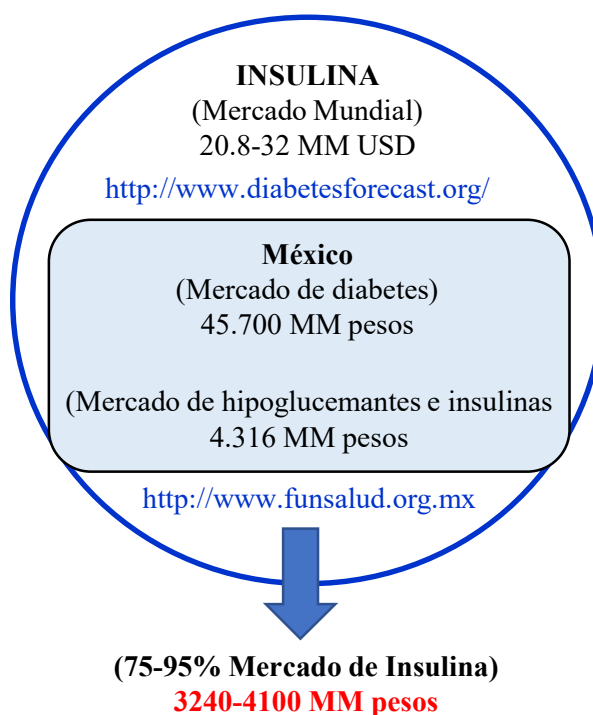
Los valores de velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación de las diferentes cepas cultivadas se compararon realizando un análisis de varianza (ANOVA) con comparaciones múltiples de medias con la prueba de Tukey con la ayuda el programa “Statgraphics Centurion XVI.II”.

Los análisis estadísticos se hicieron para un 95% de confianza.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Estudio de factibilidad técnica y económica para la producción de insulina glargina en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*

El estudio del valor del mercado global de las insulinas se consideró en más de 20 mil millones de dólares (sección 11.3). Para México, se consideró que el estudio del mercado para las diferentes variantes farmacológicas de insulinas e hipoglucemiantes, en el sector público, se estimó en un valor aproximado de 4.3 mil millones de pesos. De esta cantidad, entre el 75-95% corresponden al producto de las insulinas; o sea el valor del mercado global oscila entre 3.2-4.1 mil millones de pesos (Figura 19).



**Figura 19.** Estimación del mercado de insulina humanas. A nivel mundial el valor fue entre 20.8-32.0 mil millones (MM) de dólares y el mercado global de las diferentes variantes farmacológicas en México se estimó entre 3.2-4.1 mil millones de pesos.

El segmento del mercado de las insulinas correspondiente a las compras realizadas por el IMSS en el 2016 fue de 21.9 millones de viales; con un valor aproximado a mil millones de pesos (Tabla 20). Se observa que las compras de insulina glargina para el período 2014-2016, con respecto al total, disminuyó de 55.6%, 19.1% y 13.0%, respectivamente. Así, para el año 2016 el IMSS adquirió 1,180,652 viales (100 UI/mL,

3.64 mg/mL) del medicamento insulina glargina, con un precio promedio de 108.5 pesos/vial (www.imss.gob.mx).

**Tabla 20.** Insulinas adquiridas por el IMSS para los años 2014-2016. Se representa el valor de las compras y el porcentaje relativo al total (www.imss.gob.mx).

Tipos de insulinas	Valor de las compras (pesos mexicanos) y porcentaje relativo al total					
	2016	(%)	2015	(%)	2014	(%)
Glargina	\$128,100,786.60	13.0	\$94,471,200.00	19.1	\$307,266,820.79	55.6
NPH	\$661,293,402.00	66.9	\$243,165,476.80	49.1	\$205,762,175.42	37.3
Lispro	\$198,671,922.06	20.1	\$157,340,020.88	31.8	\$39,047,739.35	7.1
Total	\$988,066,110.66		\$494,976,697.68		\$552,076,735.56	

La insulina glargina se seleccionó como el producto prototipo a evaluar. El total de viales adquirido por el IMSS en el 2016 representó una cantidad en masa equivalente a aproximadamente 43 kg. A partir de estos datos es posible calcular el volumen de fermentación requerido para satisfacer la demanda del sector de mercado de la insulina glargina para el IMSS.

La cantidad de proteína glargina en una fermentación es:

$$P = P_s * V_s$$

**Ecuación 12.** Cálculo de la cantidad de proteína precursor de insulina glargina en un fermentador. Donde,  $P_s$ , concentración de proteína glargina en el sobrenadante de cultivo.  $V_s$ , volumen del sobrenadante de cultivo celular.

El total de proteína en un número de lotes ( $N_L$ ) es:

$$P = P_s * V_s * N_L$$

**Ecuación 13.** Cálculo de la cantidad de proteína precursor de insulina glargina en un número de lotes  $N_L$ . Donde,  $P_s$ , concentración de proteína glargina en el sobrenadante de cultivo.  $V_s$ , volumen del sobrenadante de cultivo celular.  $N_L$ : Número de lotes.

Si multiplicamos por el recobrado total del proceso ( $\eta$ ), tendremos la cantidad total de la proteína glargina producida ( $P$ ) en un número de lotes fabricado, o sea:

$$P = \eta * P_s * V_s * N_L$$

Multiplicando y dividiendo la ecuación anterior por el volumen efectivo de fermentación, obtenemos:

$$P = \eta * P_s * (V_s/V) * N_L * V$$

Si la cantidad de proteínas que queremos obtener corresponde a la demanda del sector del mercado analizado anteriormente, entonces:

$$\text{Demanda anual (kg)} = V * P$$

El valor de  $P$  debe de ser al menos igual a la demanda anual, o sea debe de ser  $P \geq \text{Demanda anual (kg)}$  y a partir de aquí se puede calcular el volumen mínimo necesario por lote. Despejando obtenemos la Ecuación 14.

$$V = \text{Demanda anual} / \eta * (P_s * V_s/V) * N_L$$

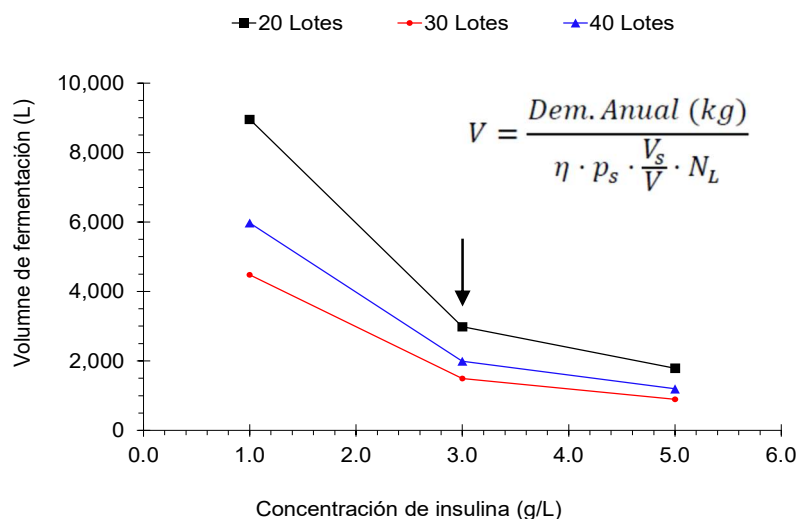
**Ecuación 14.** Cálculo para estimar el volumen necesario de fermentación para producir las cantidades de insulina glargina según la demanda del sector del mercado de interés. Donde,  $P_s$ , concentración de proteína glargina en el sobrenadante de cultivo.  $V_s$ , volumen del sobrenadante de cultivo celular.  $V$ , Volumen del cultivo,  $N_L$ , Número de lotes,  $\eta$  recobrado global del proceso.

Las unidades de medida para cada termino son:  $P$  (kg de insulina glargina),  $P_s$  (kg de insulina glargina/ $m^3$  en el sobrenadante del cultivo celular);  $\eta$ , el recobrado global del proceso (kg de insulina glargina en la fermentación/kg insulina glargina purificada),  $V$  ( $m^3$ ),  $V_s/V$  ( $m^3/m^3$ ) relación entre el volumen de sobrenadante de cultivo en la



fermentación (libre de células) y el volumen total del cultivo;  $N_L$  (número de lotes por año).

Con una demanda anual de 43 kg de insulina glargina para el IMSS, según datos de 2016, estimando un recobrado global del proceso productivo del 40% ( $\eta=0.4$ ), una relación de  $(V_s/V)=0.7$ , entonces podremos estimar el volumen necesario de fermentación para una cantidad de lotes definida en función de la concentración de proteína insulina glargina en el sobrenadante del cultivo celular (Figura 20).

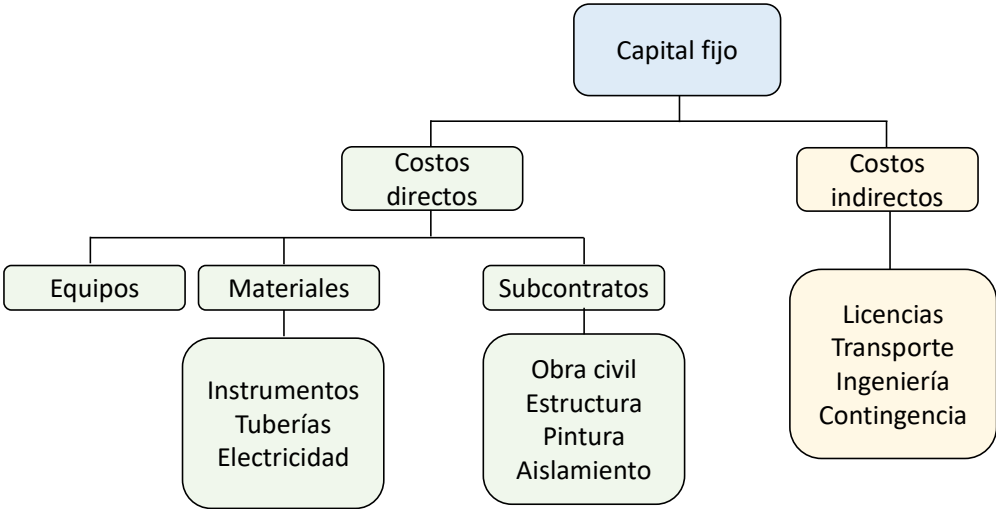


**Figura 20.** Dependencia entre el volumen efectivo de fermentación y la concentración de insulina glargina secretada al medio de cultivo con la cantidad de lotes necesarios para satisfacer la demanda anual del IMSS.  $\eta$ , recobrado total del proceso;  $p_s$ , concentración de insulina glargina en el sobrenadante del cultivo;  $V$ , volumen total del cultivo;  $V_s$ , volumen del sobrenadante (libre de células);  $N_L$ , número de Lotes. Consideraciones:  $\eta=40\%$ ,  $V_s/V=0.7$ .

Se estimó que para cubrir el segmento del mercado de glargina en el IMSS es necesario realizar 20 lotes de producción en un bio-reactor de 3 m<sup>3</sup> (Figura 20), utilizando el modelo de expresión en *P. pastoris*. Se tomó en consideración una capacidad de producción de insulina glargina de 3 g/L en el medio de cultivo libre de células y una recuperación total del producto recombinante del 40% (se incluyeron las etapas de purificación).

Se estimó el capital de inversión para una planta de dos millones de viales y la fabricación de más de 40 kg de insulina glargina, según el método de Lang (Feng y

Rangaiah, 2011). La estimación se basa en el estudio de compra del equipamiento principal. El coste del capital se representa en la Figura 21.



**Figura 21.** Distribución del coste del capital.

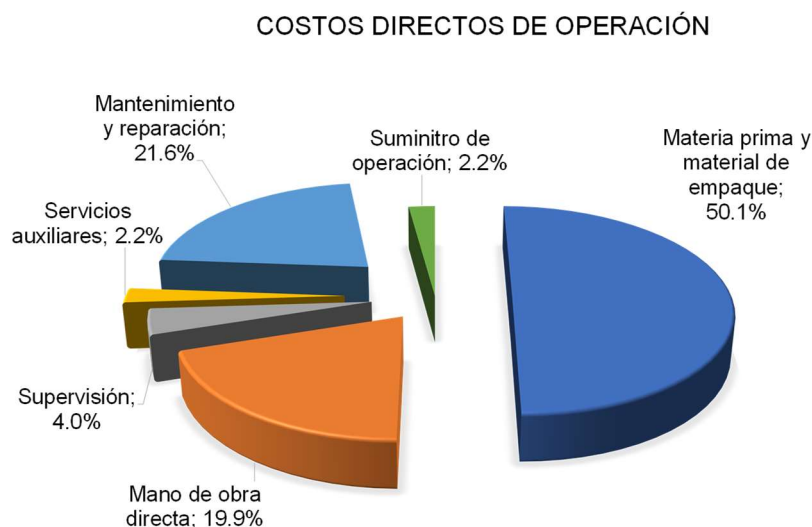
Nuestros cálculos primarios, muestra un costo inicial total de la inversión de 330 millones de pesos (Tabla 21).

**Tabla 21.** Estimados del capital de inversión.

Elemento de costo	Factor (Referido a CE)	Costo (Pesos Mx)
Costo del equipamiento (CE)	1.00	\$60,000,000
Instalación	0.50	\$30,000,000
Tuberías	0.30	\$18,000,000
Instrumentación	0.35	\$21,000,000
Aislamiento y Purificación	0.01	\$600,000
Electricidad	0.10	\$6,000,000
Construcción Civil	0.22	\$13,200,000
Movimiento de terreno	0.10	\$6,000,000
Facilidades auxiliares	0.45	\$27,000,000
<b>Subtotal (ICF)</b>		<b>\$181,800,000</b>
	Factor (Referido a ICF)	
Ingeniería	0.20	\$36,360,000
Construcción	0.30	\$54,540,000
<b>Subtotal (ICT)</b>		<b>\$90,900,000</b>
<b>CTI=ICF+ICT</b>		<b>\$272,700,000</b>
	Factor (Referido a CTI)	
Pagos contratistas	0.03	\$8,181,000
Contingencias	0.07	\$19,089,000
<b>Costo capital fijo (CCF)</b>		<b>\$299,970,000</b>
<b>IT (CFC*1,10)</b>		<b>\$329,967,000</b>

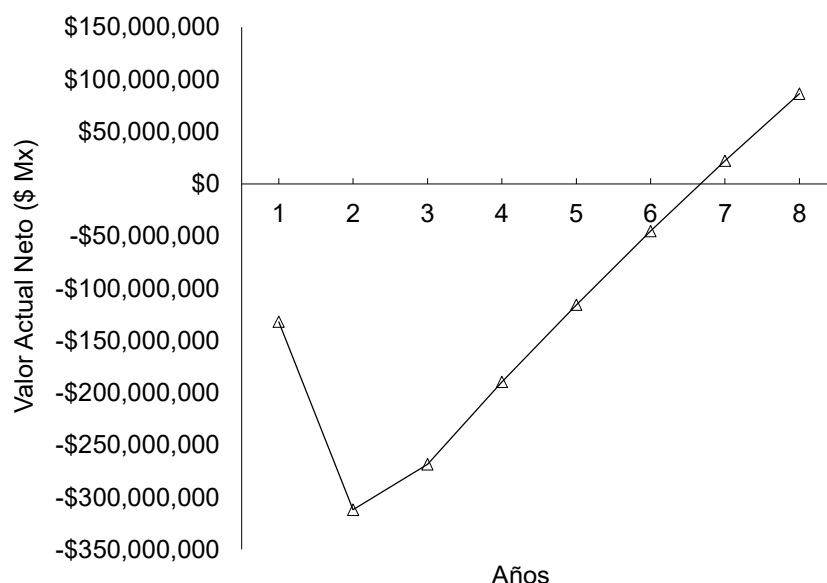
ICF: Inversión del capital fijo. ICT: Inversión del capital de trabajo. ICT: Inversión del capital fijo. IT: Inversión total

La ingeniería básica del proceso quedó integrada por la definición de las operaciones unitarias en un biorreactor de 3 m<sup>3</sup>. El proceso se conformó por las etapas de pre-inóculo, fermentación, purificación y pulido; para la fabricación del ingrediente farmacéutico activo. Se consideró la producción de 20 lotes al año a razón de 59,000 viales/lote. El costo de producción fue estimado menor de 20 centavos USD/vial, con un valor en el mercado de 6 USD/vial (108.5 pesos). De acuerdo con este análisis la materia prima representó el 50.1% de los costos directos de operación (Figura 22).



**Figura 22.** Estructura de los costos directos de operación para la fabricación de insulina humana en el modelo de *Pichia pastoris*, según el análisis realizado.

En la siguiente gráfica se muestra el recorrido del Valor Actual Neto (VAN) en el tiempo (Figura 23). Se consideró la inversión en dos años, con el 40 y 60% del valor total, respectivamente, un primer año de producción de la mitad de la cantidad necesaria de insulina glargina, un incremento en la producción del 5% anual y el valor del precio de venta de 108.5 (bb de 10 mL, 100 UI, 3.64 mg/mL), según compras de IMSS en el 2016 para este medicamento (Tabla 20). Las ventas estimadas en un período de 10 años sobrepasan el punto de equilibrio, la inversión se recupera en 7 años.

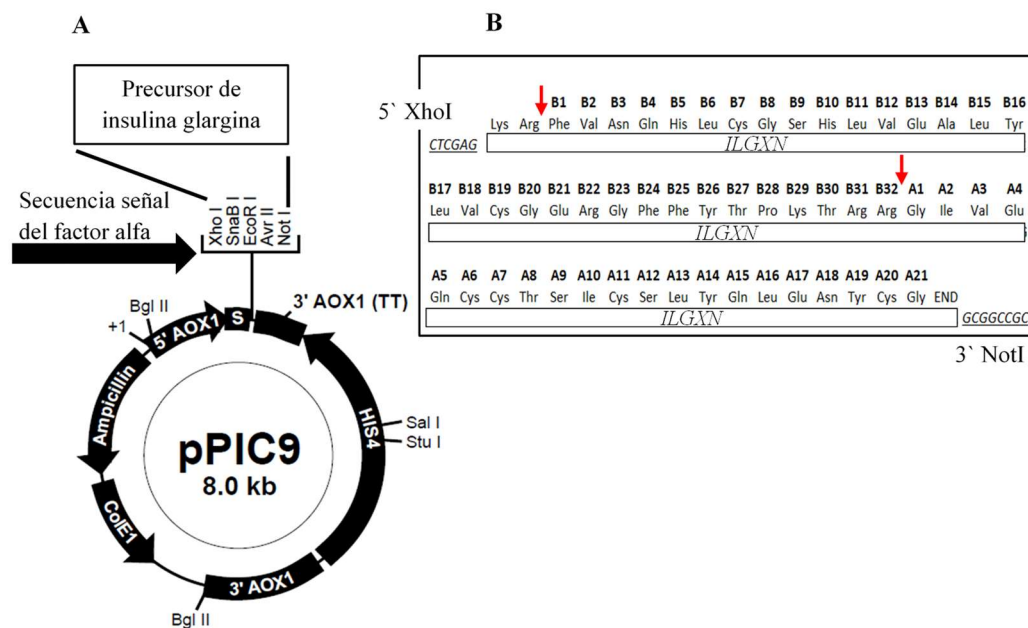


**Figura 23.** Valor Actual Neto (VAN) para el proyecto de obtención de la insulina humana en cepas de *Pichia pastoris* para satisfacer una parte del sector del mercado del IMSS. Se tuvo en cuenta lo siguiente: El costo de la inversión se realiza en dos años, incremento del 5% en las ventas y 10% en la tasa de interés.

Se obtuvo un TIR de 30.2% y un VAN de 10.3 millones de USD, indicando que el proyecto, bajo las circunstancias analizadas, reúne criterios de rentabilidad.

## 7.2 Diseño de la secuencia nucleotídica *ILGXN* que codifica para la expresión y producción de la insulina glargina

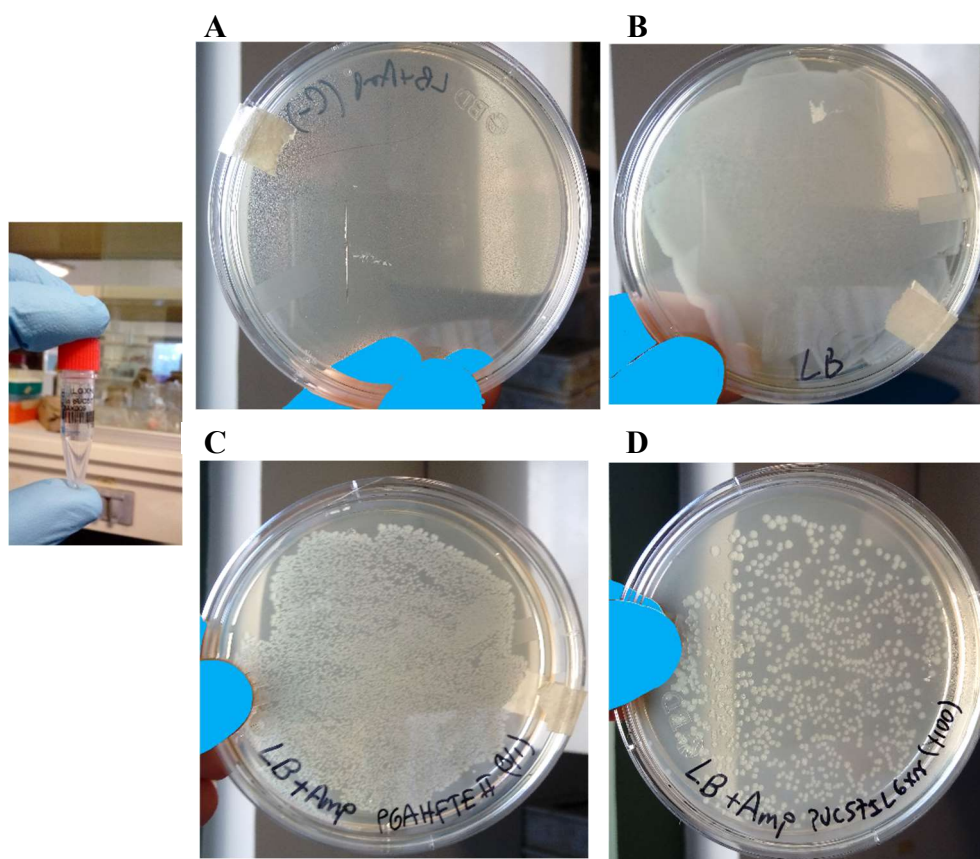
En este trabajo se diseñó una secuencia de ADN que codifica al precursor de insulina glargina (molécula monocatenaria), como un polipéptido de 53 aminoácidos, de acuerdo con la secuencia de GenBank No. AAA94416. Dicha secuencia de ADN (*ILGXN*) se clonó en el vector pUC57 (GenBank No. Y14837.1). En la Figura 24 se muestra el diseño y construcción de la cepa KM71 Mut<sup>s</sup> pPIC9ILGXN de *P. pastoris*.



**Figura 24.** Construcción de la cepa KM71 Mut<sup>s</sup> pPIC9ILGXN de *Pichia pastoris*. **A)** El mapa muestra la localización e integración del gen *ILGXN* que codifica el precursor de insulina glargina (no mostrado) dentro del vector de integración pPIC9 de *P. pastoris*. La secuencia de ácido nucleico de *ILGXN* se clonó entre el sitio XhoI, en la señal de secreción de la secuencia señal del factor alfa, y NotI, en el vector pPIC9 dentro del sitio múltiple de clonación. **B)** El gen precursor de insulina glargina y las secuencias de aminoácidos se enumeran de acuerdo con el polipéptido precursor de insulina glargina de cadena B y cadena A, respectivamente. Las flechas rojas indican los sitios teóricos de corte por la endo-proteasa Kex2. Los sitios de restricción de nucleótidos 5' y 3' se muestran en cursiva.

### 7.3 Construcción del vector pPIC9ILGXN

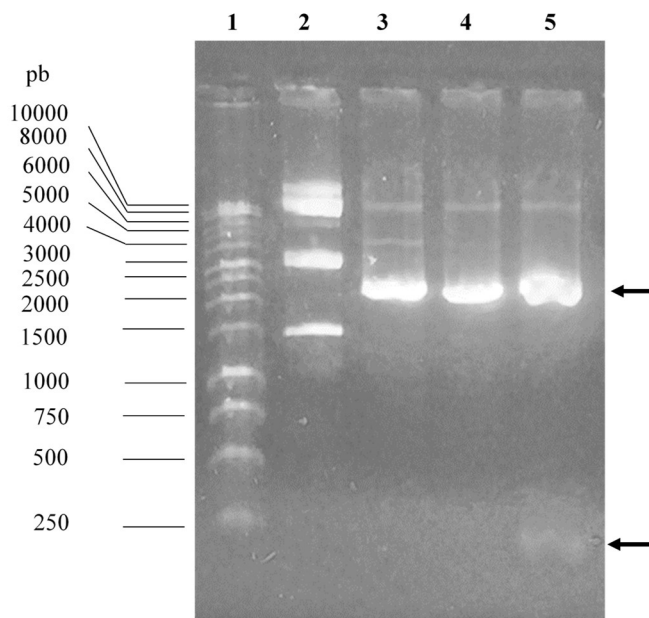
Al vector de clonación pUC57 se le insertó el gen sintético *ILGXN* que porta la secuencia nucleotídica que codifica para el precursor de insulina glargina (Figura 24). De esta forma se recibió en nuestro laboratorio como un producto el plásmido pUC57ILGXN de la casa comercial BioBASIC Inc. (Markham, Ontario, Canadá). El plásmido pUC57ILGXN se utilizó para la transformación de las células de *E. coli* TOP10 (Figura 25).



**Figura 25.** Fotos del crecimiento celular de *E. coli* TOP10 calcio competente posterior al paso de transformación celular. **A)** Células de *E. coli* TOP10 en caja Petri con medio sólido LB más Amp. (100 µg/mL), utilizada como control negativo del ensayo. **B)** Células de *E. coli* TOP10 en caja Petri con medio sólido LB, utilizada como control de viabilidad de las células calcio competentes. **C)** Células de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pGAHFTEII en caja Petri con medio sólido LB más Amp. (100 µg/mL), utilizada como control positivo del ensayo. **D)** Células de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pUC57ILGXN en caja Petri con medio sólido LB más Amp. (100 µg/mL). A la izquierda de la figura se muestra una foto del producto recibido pUC57ILGXN de BioBASIC Inc. (Markham, Ontario, Canadá). La foto del vial de la izquierda representa el producto adquirido plásmido pUC57ILGXN de la casa comercial BioBASIC Inc. (Markham, Ontario, Canadá).

Las células de *E. coli* TOP10 sin transformar no crecieron en medio LB con Amp. (Figura 25A) y si crecieron en el medio LB, mostrando un pasto característico (Figura 25B). El control positivo de la transformación resultó en el crecimiento celular de *E. coli* TOP10 pGAHFTEII en medio LB con Amp. (Figura 25C). Las células *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pUC57ILGXN crecieron en medio LB con Amp. (Figura 25D), la transformación celular resultó en el orden de  $10^6$  células/ $\mu$ g de plásmido.

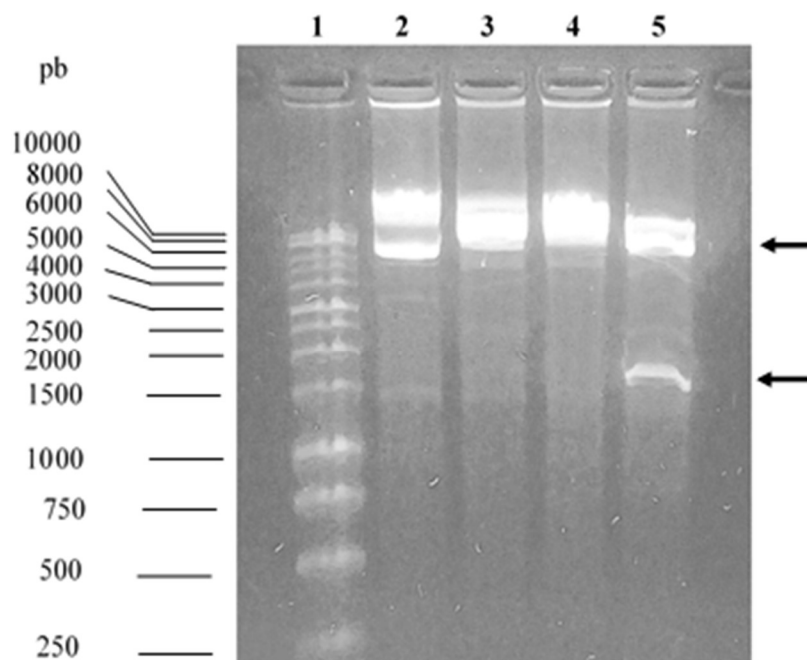
Las células de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido pUC57ILGXN se cultivaron y el paquete celular se utilizó para purificar el ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (sección 6.5.2, Tabla 6). La Figura 26 muestra el análisis en gel de agarosa que se realizó para verificar la transformación de las células de *E. coli* TOP-10 con el ADN plasmídico pUC57ILGXN, mediante análisis de restricción del plásmido usando las enzimas de restricción XhoI y NotI. El carril 2 muestra las diferentes conformaciones del ADN plasmídico. Los carriles 3-5 corresponden a las muestras de pUC57ILGXN tratada con las enzimas de restricción XhoI y/o NotI, según corresponda. En el carril 5 se observa la banda que identifica al fragmento de interés inserto *ILGXN*.



**Figura 26.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para caracterizar el plásmido pUC57ILGXN purificado de las células de *E. coli* TOP10. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Carril 2, Plásmido pUC57ILGXN purificado por el método de lisis alcalina. Carril 3, Plásmido pUC57ILGXN tratado con XhoI. Carril 4, pUC57ILGXN tratado con NotI. Carril 5, Plásmido pUC57ILGXN tratado con las enzimas XhoI y NotI. Las flechas indican (carril 5) las bandas de la migración del vector pUC57 (2710 pb) y el inserto *ILGXN* (175 pb), respectivamente. Las muestras fueron tratadas con RNasa antes de la digestión enzimática.

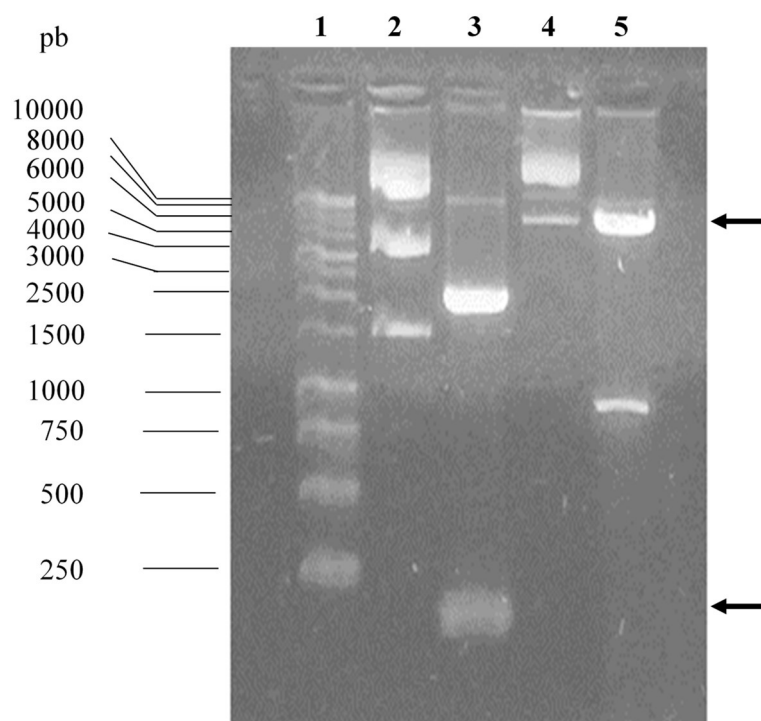


La Figura 27 muestra el análisis en gel de agarosa que se realizó para verificar la integridad del ADN plasmídico pPIC9ANTGH1S en las células de *E. coli* JM109, mediante análisis de restricción con las enzimas XhoI y NotI. El carril 2 muestra las diferentes conformaciones del ADN plasmídico. Los carriles 3-5 corresponden a las muestras de pPIC9ANTGH1S tratada con las enzimas de restricción XhoI y NotI, según corresponda. En el carril 5 se observa la banda que corresponde al inserto ANTGH1S (1708 pb) y el fragmento de interés el vector pPIC9 (7980 pb).



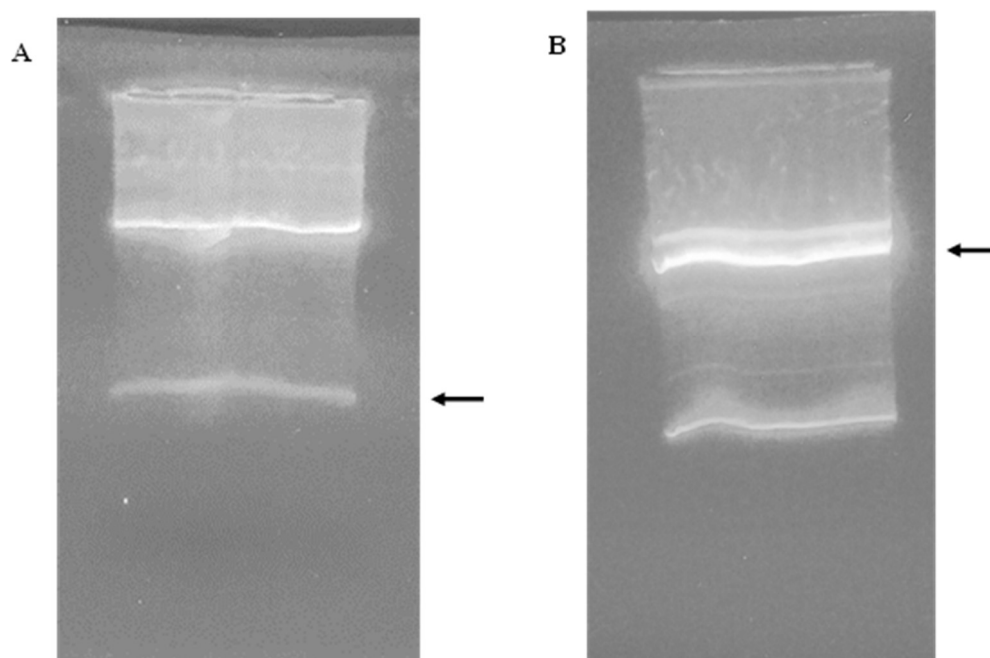
**Figura 27.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para caracterizar el plásmido pUC57ILGXN purificado de las células de *E. coli* JM109. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (PROMEGA, EE.UU.). Carril 2, Plásmido pPIC9ANTGH1S purificado por el método de lisis alcalina. Carril 3, Plásmido pPIC9ANTGH1S tratado con XhoI. Carril 4, pPIC9ANTGH1S tratado con NotI. Carril 5, Plásmido pPIC9ANTGH1S tratado con las enzimas XhoI y NotI. Las flechas indican (carril 5) las bandas de la migración del vector pUC57 (7980 pb) y el inserto ANTGH1S (1708 pb), respectivamente. Las muestras fueron tratadas con RNasa antes de la digestión enzimática.

La Figura 28 muestra el análisis, a escala analítica, de una electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S purificados a escala preparativa y el mapa de restricción obtenido posterior a la digestión enzimática con las enzimas de restricción XhoI y NotI. Los carriles 3 y 5 muestran los fragmentos de ADN de interés, inserto *ILGXN* (175 pb) y el vector pPIC9 (7980 pb), respectivamente.



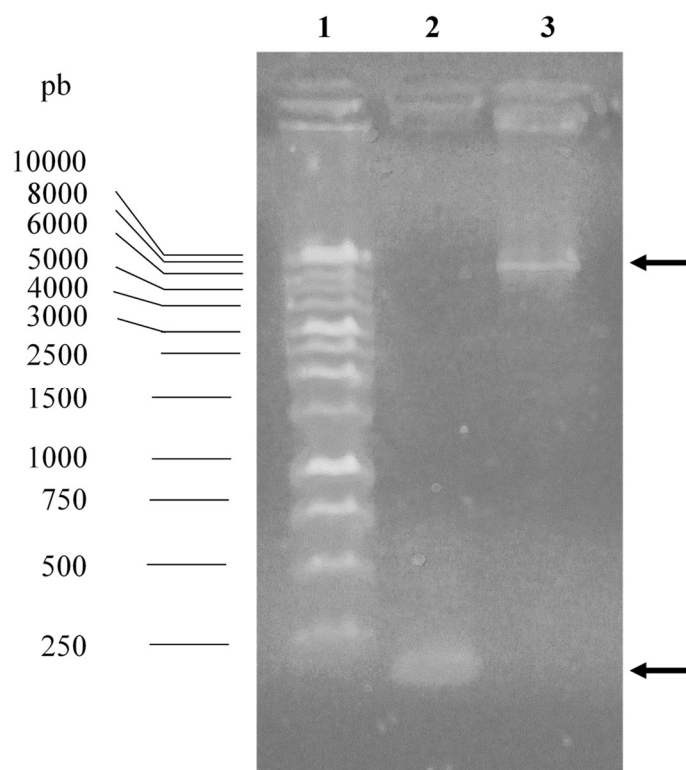
**Figura 28.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para los plásmidos pUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S y un mapa de restricción. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Carril 2, Plásmido pUC57ILGXN purificado por el método de lisis alcalina. Carril 3, Plásmido pUC57ILGXN tratado con las enzimas XhoI y NotI. Carril 4, Plásmido pPIC9ANTGH1S. Carril 5, Plásmido pPIC9ANTGH1S tratado con las enzimas XhoI y NotI. Las flechas indican el fragmento de 175 pb correspondiente al inserto (*ILGXN*), en el carril 3, y el vector pPIC9, con 7980 pb, en el carril 5. Las muestras fueron tratadas con RNasa antes de la digestión enzimática.

Una vez corroborado a escala analítica la eficacia de corte de los plásmidos pPUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S con las enzimas de restricción XhoI y NotI, la separación del inserto *ILGXN* (Figura 28, carril 3) y el vector pPIC9 (Figura 28, carril 5) posterior a un análisis de electroforesis en gel de agarosa; se prosiguió a realizar el procedimiento a escala preparativa. La Figura 29 muestra las electroforesis en gel de agarosa del procedimiento de digestión enzimática de pPUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S con las enzimas de restricción XhoI y NotI a escala preparativa. Las flechas indican los fragmentos de interés: inserto *ILGXN* (Figura 29A) y vector pPIC9 (Figura 29B).



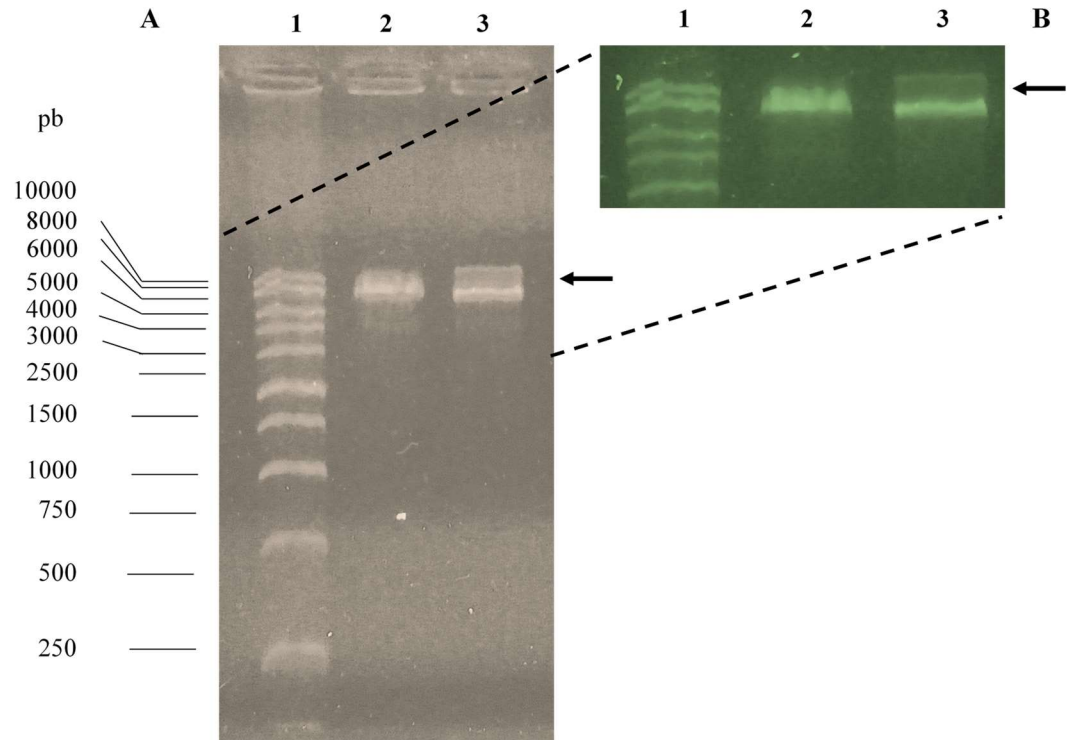
**Figura 29.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a escala preparativa luego de la purificación de los plásmidos pPUC57ILGXN y pPIC9ANTGH1S y una digestión enzimática con las enzimas de restricción XhoI y NotI. **A)** Plásmido pPUC57ILGXN luego de la doble digestión enzimática, la flecha indica el fragmento de interés inserto *ILGXN*. **B)** Vector pPIC9ANTGH1S luego de la doble digestión enzimática, la flecha indica el fragmento de interés vector pPIC9.

A partir de la electroforesis de agarosa a escala preparativa (Figura 29) se aislaron, purificaron y prepararon los fragmentos inserto *ILGXN* (Figura 30, carril 2) y vector pPIC9 (Figura 30, carril 3). Ambos fragmentos de ADN se cuantificaron y se usaron para realizar la ligación.



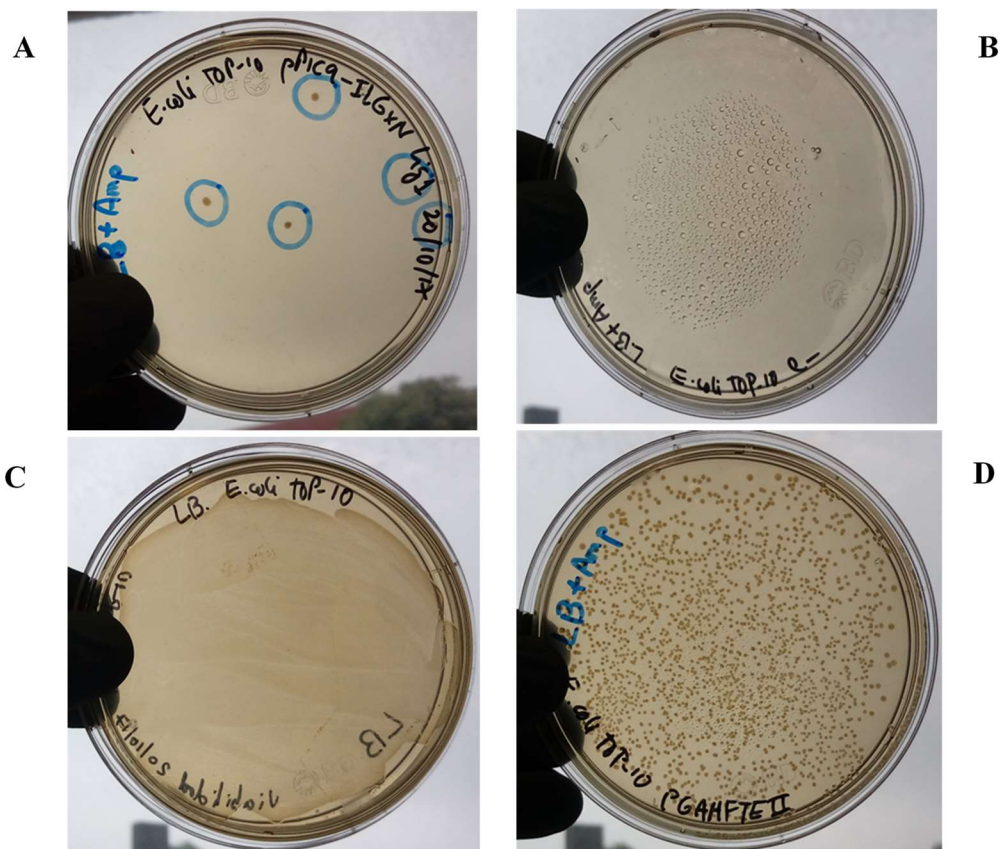
**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del inserto *ILGXN* y vector pPIC9 purificados. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Carril 2, Fragmento inserto *ILGXN* purificado. Carril 3, Fragmento vector pPIC9 purificado. Las flechas indican el fragmento del inserto *ILGXN* (175 pb) y el vector pPIC9 (7980 pb).

La Figura 31 muestra el gel de agarosa posterior al ensayo de ligación. El carril 3 muestra un barrido encima de la banda correspondiente al vector pPIC9, indicativo de posible ligación entre el inserto *ILGXN* y el vector pPIC9.



**Figura 31.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% posterior al ensayo de ligación. **A)** Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder Ladder (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Carril 2, Fragmento vector pPIC9 antes del ensayo de ligación. Carril 3, Muestra de la ligación. **B)** Una ampliación de la zona de interés. Las flechas muestran un barrido superior a la banda del vector pPIC9 posterior a la ligación, indicando que se realizó la ligación entre el inserto *ILGXN* y el vector pPIC9.

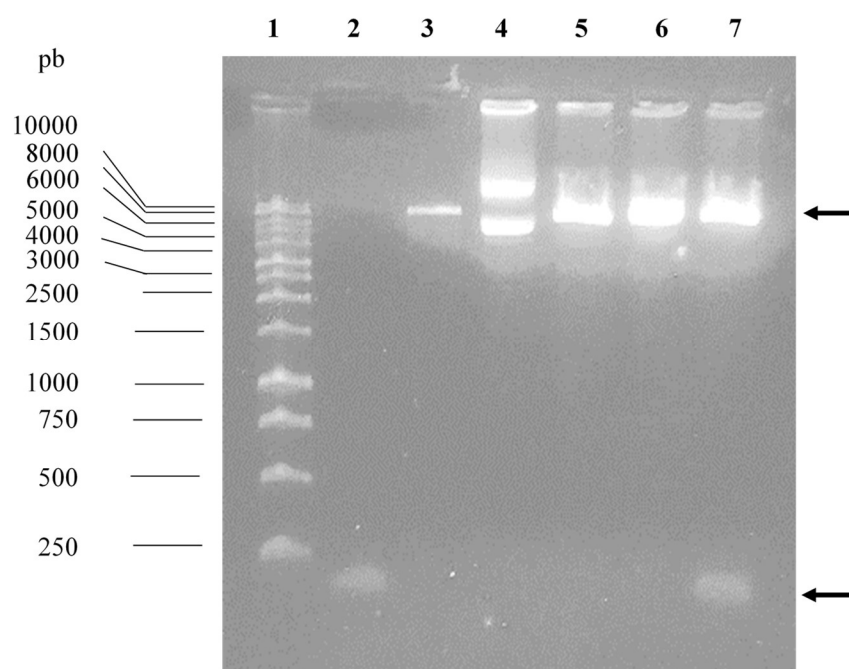
El producto de la ligación entre el inserto *ILGXN* y el vector pPIC9 se utilizó para realizar una transformación celular (sección 6.5.2). La Figura 32A muestra una foto de las cinco colonias transformadas que crecieron en medio sólido con marcador de selección.



**Figura 32.** Fotografía del resultado posterior al paso de transformación celular de *Escherichia coli* TOP10 y controles del ensayo. **A)** Células de *E. coli* TOP10 competentes transformadas con el producto de ligación inserto *ILGXN* y vector pPIC9 (caja Petri con medio sólido LB con Amp. (100 µg/mL)). **B)** Células de *E. coli* TOP10 competentes en caja Petri con medio sólido LB con Amp. (100 µg/mL), utilizada como control negativo. **C)** Células de *E. coli* TOP10 competentes en caja Petri con medio sólido LB, utilizada como control de viabilidad celular. **D)** Células de *E. coli* TOP10 competentes transformadas con el plásmido pGAHFTEII en caja Petri con medio sólido LB con Amp. (100 µg/mL), utilizada como Control positivo. Las células se extendieron con ayuda de un asa de extensión.

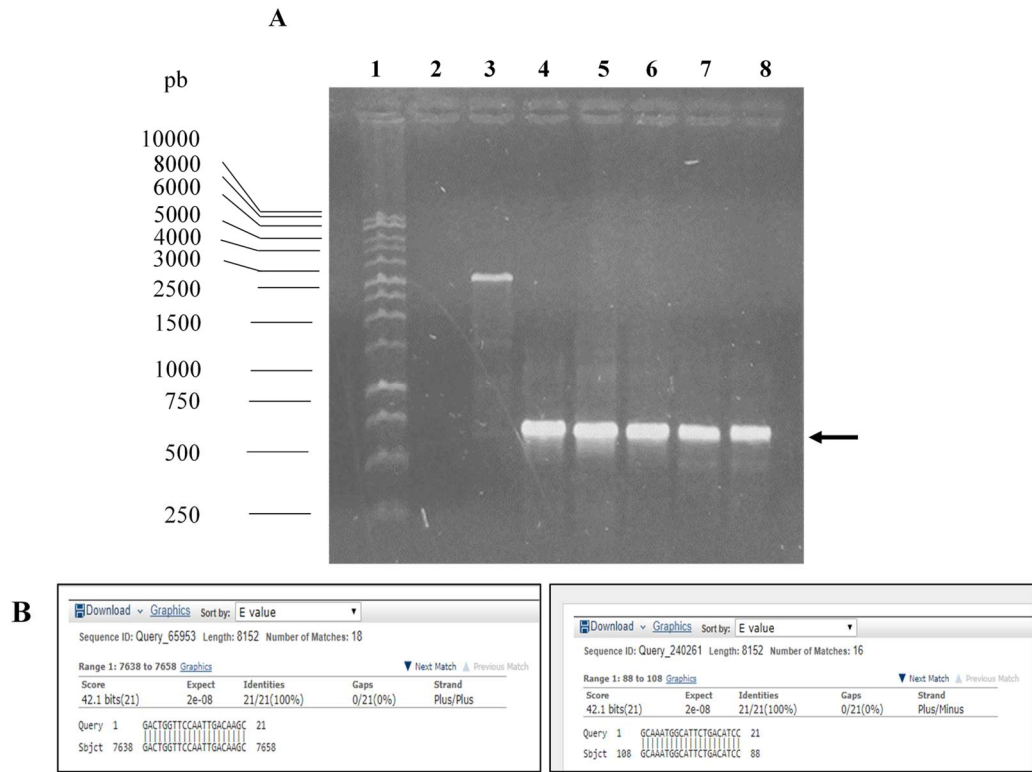
Las células de *E. coli* TOP10 transformadas con el producto de la ligación inserto *ILGXN* y vector pPIC9 se cultivaron (sección 6.5.2) y el paquete celular se utilizó para purificar el ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Tabla 6).

La Figura 33 muestra el análisis de una electroforesis en gel de agarosa que se realizó para verificar la identidad del ADN plasmídico pPIC9ILGXN aislado de las células de *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido, mediante análisis de restricción usando las enzimas de restricción XhoI y NotI. El carril 4 muestra las diferentes conformaciones del ADN plasmídico pPIC9ILGXN. Los carriles 5 y 6 corresponden a las muestras de pPIC9ILGXN tratada con las enzimas de restricción XhoI y/o NotI, según corresponda. En el carril 7 se observa la banda que identifica al fragmento de interés *ILGXN*. (175 pb) posterior a una doble digestión enzimática del plásmido pPIC9ILGXN con las enzimas de restricción XhoI y NotI.



**Figura 33.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para caracterizar el plásmido pPIC9ILGXN purificado de las células de *Escherichia coli* TOP10. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Carril 2 y 3, fragmentos del inserto *ILGXN* y vector PIC9 utilizados para el ensayo de ligación, respectivamente. Carril 4, Plásmido pPIC9ILGXN purificado por el método de lisis alcalina. Carril 5, Plásmido pPIC9ILGXN tratado con XhoI. Carril 6, Plásmido pPIC9ILGXN tratado con NotI. Carril 7, Plásmido pPIC9ILGXN tratado con las enzimas de restricción XhoI y NotI. Las flechas indican (carriles 2 y 7) las bandas de la migración del fragmento *ILGXN* (175 pb), respectivamente, y la banda del fragmento vector pPIC9 (carril 7). Las muestras fueron tratadas con RNasa antes de la digestión enzimática.

En la Figura 34A se muestra el resultado de la caracterización por PCR del plásmido construido y se presenta el análisis por electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado empleando oligonucleótidos específicos. Los carriles 4-8 muestran la banda amplificada (623 pb) obtenida para las cinco colonias de *E. coli* TOP10 pPIC9ILGXN. La Figura 34B muestra el cálculo “*in silico*” del tamaño del amplicón.

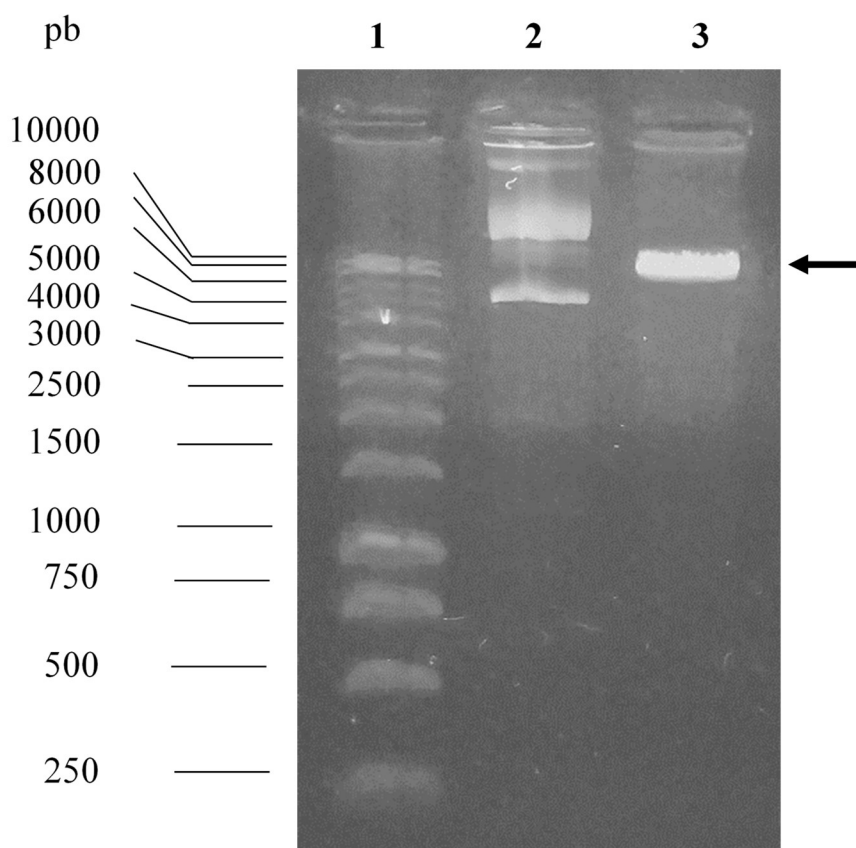


**Figura 34.** Caracterización por PCR de pPIC9ILGXN. **A)** Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR de pPIC9ILGXN pPIC9ILGXN. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Carril 2, Control negativo del ensayo de PCR. Carril 3, Control positivo del ensayo de PCR (DNA genómico *P. pastoris*  $\alpha$ -Glu) Carril 4-8, Producto de la PCR para el ADN plasmídico pPIC9ILGXN obtenido de *E. coli* TOP10 pPIC9ILGXN. La flecha indica el tamaño del amplicón esperado (623 pb). **B)** Resultados del análisis “*in silico*” de la región de hibridación de los iniciadores 5’AOX1, 3’AOX1 en el plásmido pPIC9ILGXN (alineamiento). El resultado muestra un amplicón de talla molecular de 623 pb. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron los de AOX1: Oligo 5’AOX1: 5’-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3’. Oligo 3’AOX1: 5’-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3’.



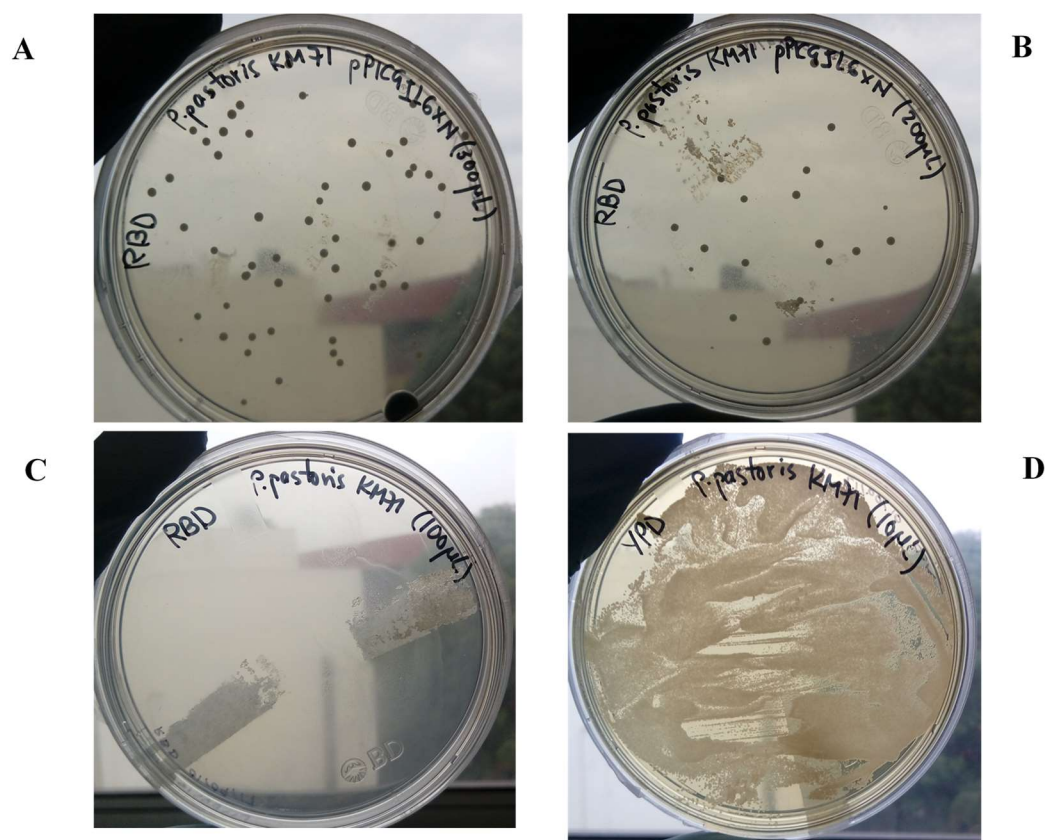
#### 7.4 Construcción de la cepa recombinante de *Pichia pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> pPIC9ILGXN

Una vez demostrada la construcción e identidad del vector pPIC9ILGXN se procedió a realizar la purificación de ADN plasmídico de una de las colonias de *E. coli* TOP10 pPIC9ILGXN (sección 6.5.3). La Figura 35 muestra el resultado de una electroforesis en gel de agarosa de la purificación a escala preparativa y preparación del plásmido pPIC9ILGXN, el cual se utilizó para transformar células de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> electro-competentes.



**Figura 35.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% luego de la purificación a escala preparativa del plásmido pPIC9ILGXN a partir de células de *Escherichia coli* TOP10 pPIC9ILGXN. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Carril 2, Plásmido pPIC9ILGXN purificado a escala preparativa por el método de lisis alcalina. Carril 3, Plásmido pPIC9ILGXN purificado a escala preparativa por el método de lisis alcalina y linealizado con la enzima de restricción SalI (Takara Bio Inc., Shiga, Japón). La flecha indica el plásmido pPIC9ILGXN linealizado (8152 pb).

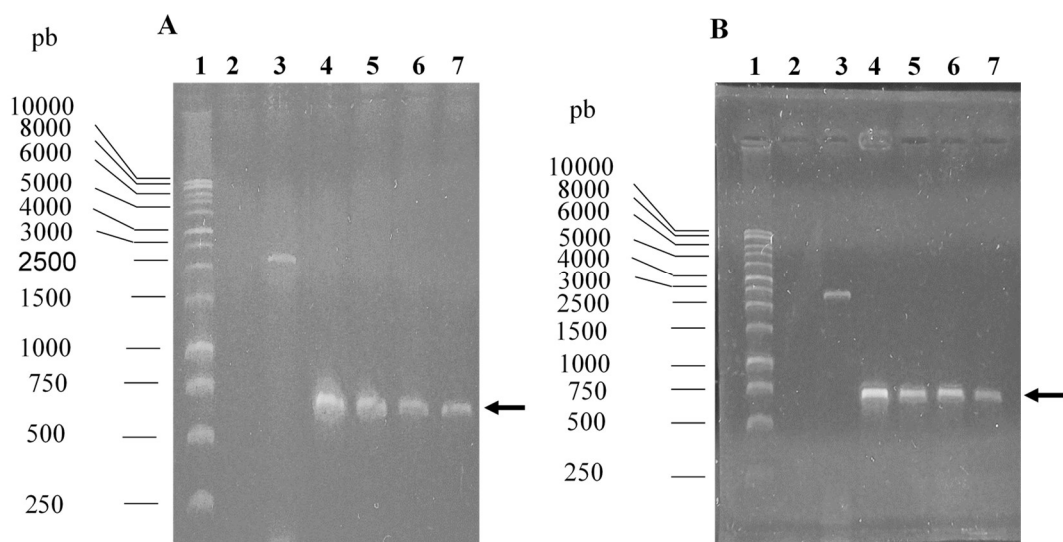
El vector de expresión pPIC9ILGXN linealizado se utilizó para transformar las células de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> electro-competente con auxotrofia a Histidina. Luego de la electroporación de las células de *P. pastoris* con el plásmido pPIC9ILGXN (previamente linealizado con la enzima de restricción SalI), las células se crecieron en caja Petri en medio selectivo. Se obtuvo un total de 80 clonas *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> pPIC9ILGXN con características morfológicas de las células de *P. pastoris*. La Figura 36 muestra el resultado luego de la transformación de *P. pastoris* KM71 con pPIC9ILGXN.



**Figura 36.** Fotografía del resultado posterior al paso de transformación de las células de *Pichia pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> electro-competentes y controles del ensayo. **A y B)** Células de *P. pastoris* KM71 transformadas con el plásmido pPIC9ILGXN (previamente linealizado con la enzima de restricción SalI), las células crecieron en caja Petri con medio selectivo RBD His<sup>-</sup>. **C)** Células de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> electro-competentes en medio selectivo RBD His<sup>-</sup>, utilizada como control negativo del ensayo. **D)** Células de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> electro-competentes en medio YPD, utilizada como control de viabilidad celular del ensayo. Las células se extendieron con ayuda de un asa de extensión.

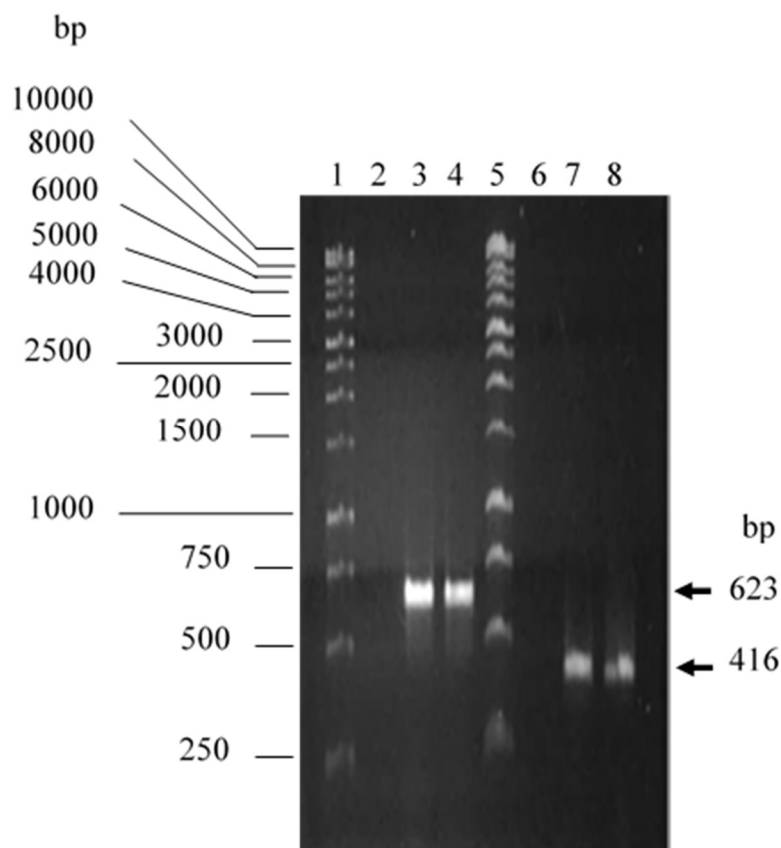
## 7.5 Caracterización genotípica de las cepas recombinantes *Pichia pastoris* KM71ILGXN construidas

De las 80 colonias de *P. pastoris* KM71ILGXN transformadas se seleccionaron al azar cuatro colonias de cada caja Petri (Figura 36 A y B) y se analizaron por PCR. En la Figura 37 se muestra el resultado de las electroforesis en gel de agarosa para el análisis del producto amplificado por PCR. En ambas figuras se observan bandas intensas de talla molecular de 623 pb. De esta forma se demostró la integridad del casete de expresión pPIC9ILGXN en el genoma de las células de *P. pastoris*, obteniéndose así clonas recombinantes de *P. pastoris* con fenotipo pPIC9ILGXN His<sup>+</sup>.

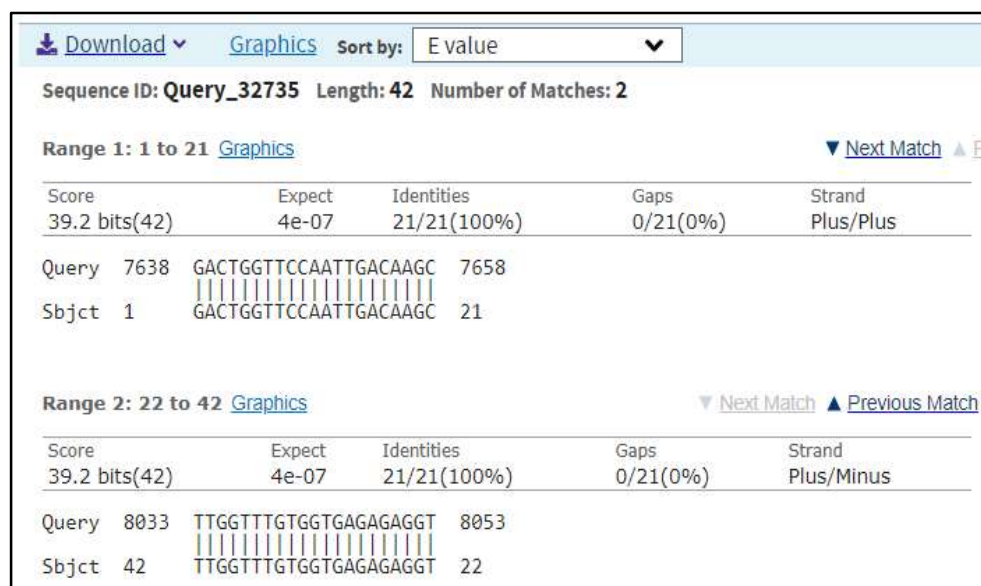


**Figura 37.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para detectar el producto amplificado por PCR para caracterizar las colonias de *Pichia pastoris* KM71 pPIC9ILGXN. **A)** Análisis de cuatro clonas seleccionadas al azar de una placa (Figura 36A) y **B)** de la otra placa (Figura 36B). Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Carril 2, Control negativo del ensayo de PCR. Carril 3, Control positivo del ensayo de PCR (DNA genómico *P. pastoris* pPIC9ANTGH1S (1708 pb). Carriles 4-7, Producto de la PCR de las clonas de *P. pastoris* KM71 pPIC9ILGXN, figura **A)** clonas 1-4 seleccionadas al azar y **B)** clonas 5-8 seleccionadas al azar. La flecha indica el tamaño del amplicón esperado (623 pb). El resultado del análisis “*in silico*” de la región de hibridación de los iniciadores 5' AOX1, 3' AOX1 en el plásmido pPIC9ILGXN (el alineamiento) se muestra en la Figura 34B. El resultado muestra un amplicón de talla molecular de 623 pb. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizado fueron:  
Oligo 5' AOX1: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'.  
Oligo 3' AOX1: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'.

Adicionalmente, las muestras de ADN plasmídico purificado de una colonia al azar de *E. coli* TOP10 pPIC9ILGXN y el ADN genómico de la cepa *P. pastoris* KM71 pPIC9ILGXN Col.#77 se analizaron por PCR utilizando una segunda pareja de oligonucleótidos (Figura 38) dirigida a la región de la secuencia codificante para ILGXN. La Figura 39 muestra el cálculo “*in silico*” del tamaño del amplicón.



**Figura 38.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% realizado posterior al ensayo de PCR para caracterizar el plásmido pPIC9ILGXN obtenido de una colonia al azar de *Escherichia coli* TOP10 pPIC9ILGXN y verificar la integración del casete de expresión en el genoma de *Pichia pastoris* KM71 pPIC9ILGXN Col.#77. Carriles 1 y 5, marcador de tamaño molecular 1 kb Ladder (PROMEGA, EE.UU.). Carriles 2 y 6, controles negativos del ensayo de PCR. Carriles 3 y 4, producto de PCR (623 pb) del ADN plasmídico pPIC9ILGXN y ADN genómico de la cepa recombinante de *P. pastoris*, respectivamente. Se usaron los oligonucleótidos de AOX1. Carriles 7 y 8, producto de PCR (416 pb) del ADN plasmídico pPIC9ILGXN y ADN genómico de la cepa recombinante de *P. pastoris*, respectivamente. Se usaron los oligonucleótidos 5'AOX1 y 3'ILGXN. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizado fueron:  
 Oligo 5'AOX1: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'.  
 Oligo 3'AOX1: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'.  
 Oligo específico 3ILGXN: 5'-ACCTCTCTCACCACAAACCAA-3'.



**Figura 39.** Resultado del análisis “*in silico*” de la región de hibridación de los iniciadores 5’AOX1 y 3’ILGXN en el plásmido pPIC9ILGXN (alineamiento). El producto de la PCR muestra un amplicón de talla molecular de 416 pb. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizado fueron:  
 Oligo 5’AOX1: 5’-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3’.  
 Oligo específico 3ILGXN: 5’-ACCTCTCTCACCACAAACCAA-3’.  
 Se usó en programa de alineamiento local “blastn” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

El tamaño total (623 pb) del fragmento de la primera banda (Figura 38, carril 3) corresponde a la señal de pre-pro-secreción del factor alfa de *S. cerevisiae* (255 pb) y las secuencias codificantes de *ILGXN* (162 pb), y fragmentos del sitio de clonación múltiple del vector pPIC9 (13 pb), promotor AOX1 (94 pb) y el terminador de la transcripción (99 pb). El tamaño total del fragmento (416 pb) de la segunda banda (Figura 38, carril 7) contiene un fragmento del promotor AOX1 (94 pb) y la señal de pre-pro-secreción del factor alfa (255 pb) y un fragmento de las secuencias codificantes de *ILGXN* (67 pb).

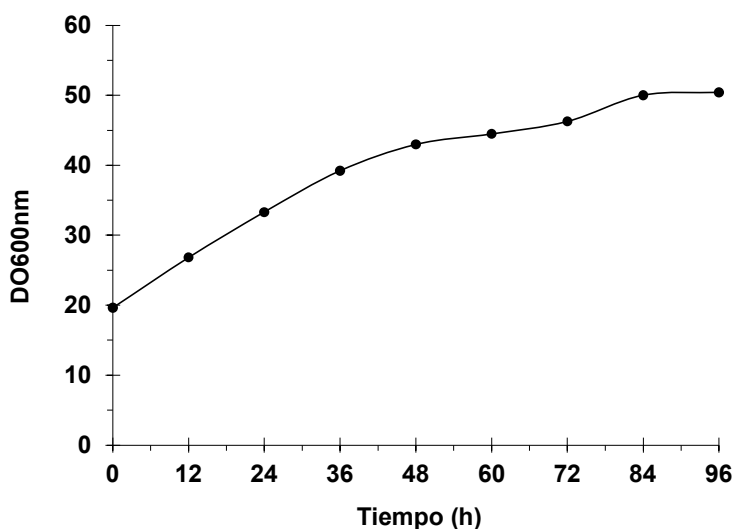
Estos resultados confirmaron la correcta integración del casete de expresión en el genoma de *P. pastoris* y confirmaron el fenotipo Mut<sup>s</sup>.

## 7.6 Caracterización fenotípica de las cepas recombinantes *Pichia pastoris*

### KM71ILGXN construidas

La caracterización fenotípica de las cepas recombinantes KM71ILGXN construidas se llevó a cabo mediante la evaluación de la inducción del gen heterólogo (gen sintético que codifica para el precursor de insulina glargina) en cultivos en condiciones de inducción y se evaluó, durante una cinética, el crecimiento celular (mediciones de  $DO_{600nm}$ ), la concentración de proteínas totales y la producción extracelular en el medio de cultivo libre de células y de la proteína recombinante. Además, se ensayaron tres técnicas analíticas diferentes para identificar la presencia de la molécula insulina glargina.

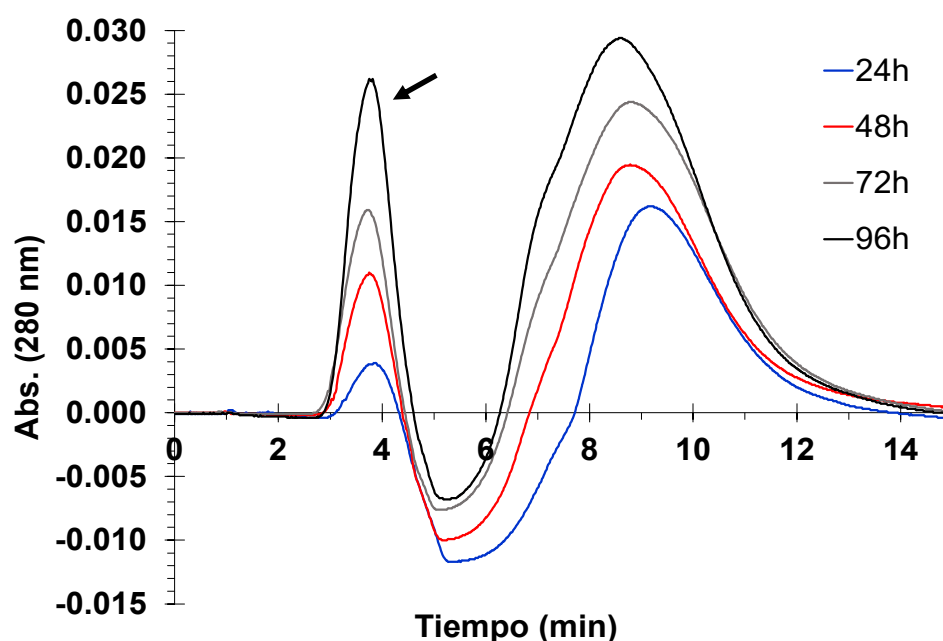
Una cepa de *P. pastoris* KM71ILGXN seleccionada al azar se cultivó bajo condiciones de inducción del gen heterólogo con MeOH (sección 6.5.5.1). El transformante seleccionado alcanzó una  $DO_{600nm}$  final de 50.3 posterior a 96 h de cultivo en metanol. La Figura 40 muestra la cinética del cultivo.



**Figura 40.** Cinética de crecimiento de un transformante de *Pichia pastoris* KM71ILGXN seleccionado al azar y crecida en presencia de metanol. Las células se cultivaron en medio de cultivo BMM en condiciones de inducción del gen heterólogo. El MeOH se adicionó cada 12 h para una concentración final de 0.75% (v/v). Se tomaron muestras cada 12 h para medir la  $DO_{600nm}$  y determinar la concentración de proteínas totales (sección 6.5.5.2).

Las muestras tomadas durante la cinética del cultivo celular se analizaron para la determinación de proteínas totales (sección 6.5.5.2) y se determinaron perfiles por cromatografía de filtración en gel (Columna cromatográfica PD-10). Los valores de concentración de proteínas totales se incrementaron a lo largo del tiempo durante la cinética y la muestra de las 96 h de cultivo celular mostró el máximo valor, alcanzado 74.3 mg/L.

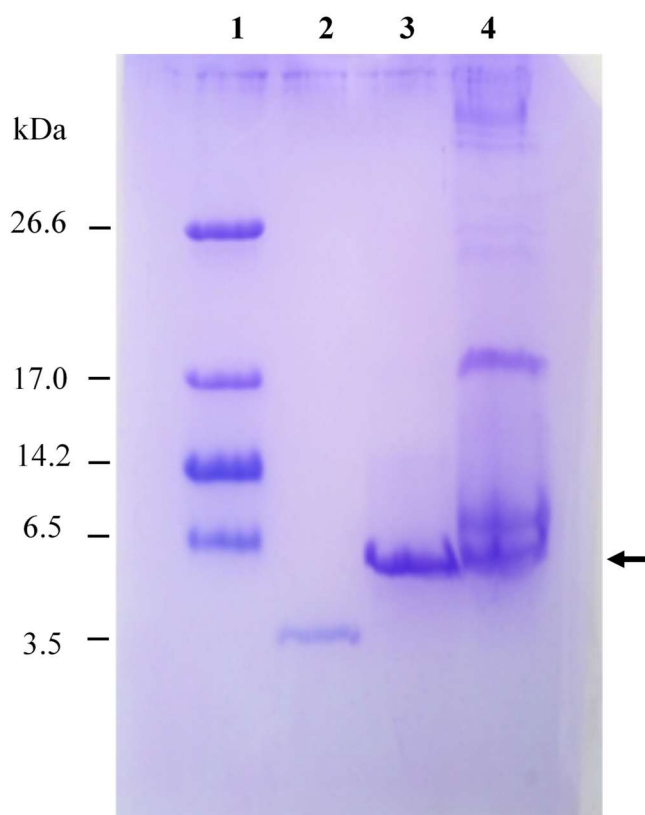
La Figura 41 muestra la comparación de los perfiles cromatográficos de los sobrenadantes de cultivo libre de células (muestras tomadas cada 24 h). Se observó un incremento del área bajo la curva de la fracción donde eluyen las proteínas (primer pico), corroborando el aumento de la concentración de proteínas totales durante la cinética del cultivo celular.



**Figura 41.** Comparación de los perfiles cromatográficos de filtración en gel (Sephadex G25 M), usando una columna PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA) de las muestras de sobrenadante de un cultivo celular durante una cinética de crecimiento. Se aplicaron muestras de sobrenadante de cultivo libre de células. Las muestras del cultivo se analizaron cada 24 h. La primera fracción corresponde a las proteínas eluidas de la columna y se colectó en solución tampón acetato de sodio 100 mM pH 3.6. La flecha corresponde al pico colectado cuando se aplicó el sobrenadante de cultivo de 96 h.

La muestra colectada a las 96 h del sobrenadante de cultivo celular (Figura 40) se aplicó a una cromatografía de filtración en gel (Figura 41) para separar las proteínas del medio de cultivo, o sea realizar un cambio de solución tampón (o desalado). La fracción donde eluyen las proteínas fue colectada y concentrada (sección 6.5.5.3). Luego la muestra concentrada se analizó por la técnica de SDS-PAGE.

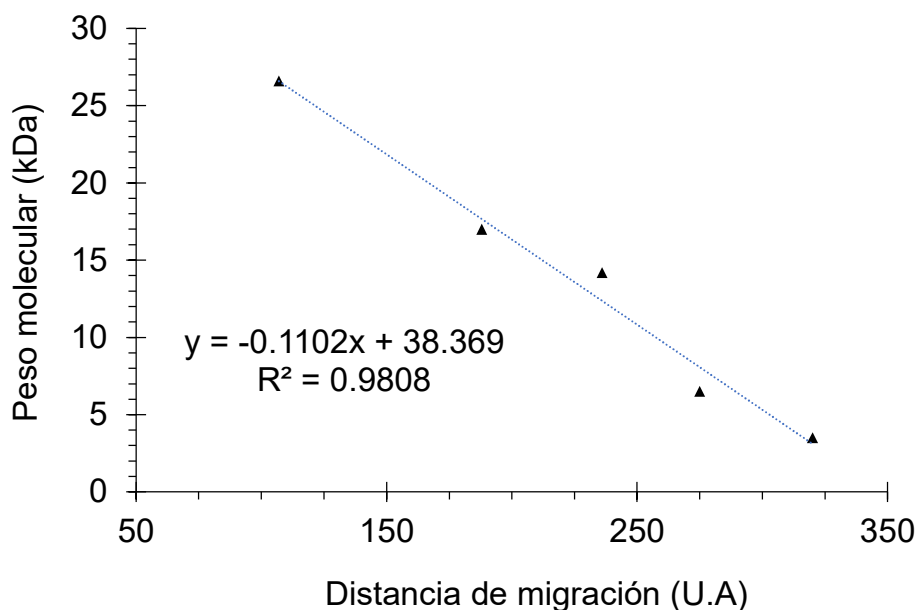
El análisis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes reveló, a simple inspección visual, una banda de aproximadamente 6 kDa (Figura 42, carril 4) como la principal proteína extracelular.



**Figura 42.** Análisis de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Carril 1, marcador de peso molecular de rango ultra bajo (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.). Carril 2, insulina glargina comercial Galactus (Laboratorios PiSA S.A. de C.V., Guadalajara, JAL, México). Carril 3, fracción cromatográfica de intercambio catiónico eluida a pH 8.0 (Figura 58). Carril 4, medio de cultivo celular libre de células, desalado y concentrado a partir de la inducción de 96 h con metanol de la cepa *P. pastoris* KM71ILGXN en un matraz con agitación.

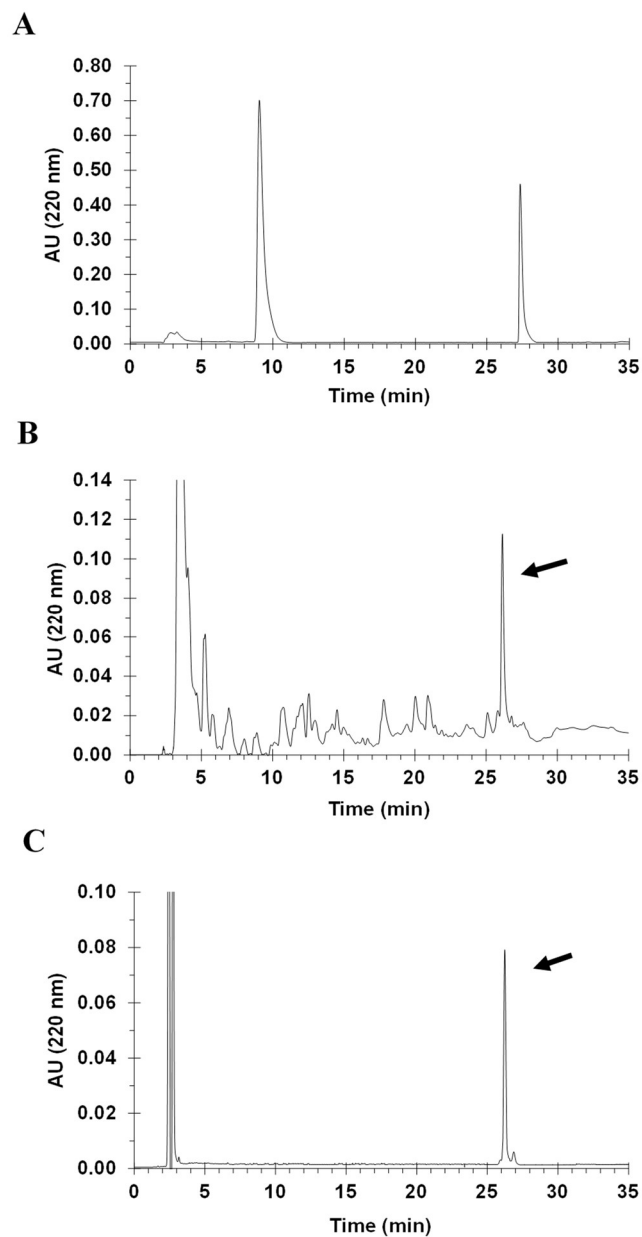


El cálculo de la estimación del peso molecular del precursor de insulina glargina se realizó a partir de una ecuación lineal que se ajustó a los valores de la curva patrón que se muestra en la siguiente figura (Figura 43). El valor estimado fue de 6.08 kDa.



**Figura 43.** Estimación del peso molecular del precursor de insulina glargina. Se representa la curva del marcador de peso molecular de rango ultra bajo (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) en función de la distancia de migración en el gel de poliacrilamida. La ecuación de la estimación de la tendencia lineal de los puntos del gráfico se utilizó para estimar el peso molecular del precursor de insulina glargina (293 U.A). U.A: unidades arbitrarias.

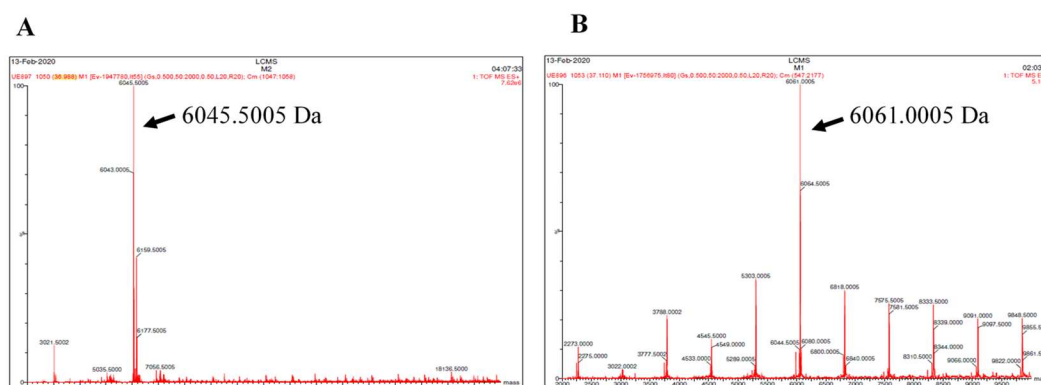
El análisis por RP-HPLC del sobrenadante de cultivo libre de células posterior a las 96 h de cultivo celular bajo condiciones de inducción mostró un pico mayoritario (Figura 44B) con un tiempo de retención de 1.19 min, menor al que migró la insulina glargina comercial (Figura 44A). El cromatograma 44C muestra la fracción eluida a pH 8.0 del paso cromatográfico de intercambio catiónico (Figura 58), se observa un pico correspondiente al precursor de insulina glargina con tiempo de retención de 26.21 min.



**Figura 44.** Perfiles cromatográficos de fase reversa en HPLC para: **A)** insulina glargina comercial Galactus (Laboratorios PiSA S.A. de C.V., Guadalajara, JAL, México), se observa un pico con un tiempo de retención de 27.35 min. **B)** muestra de medio de cultivo libre de células a 96 h de inducción con metanol de la cepa *P. pastoris* KM71ILGXN en matraz con agitación, se observa un pico de insulina glargina monocatenaria con un tiempo de retención de 26.16 min. **C)** Muestra de la fracción eluida a pH 8.0 del paso cromatográfico de intercambio catiónico (Figura 58), se observa un pico correspondiente al precursor de insulina glargina con tiempo de retención de 26.21 min. Las condiciones de las corridas cromatográficas se describen en la sección 6.5.5.4.

Además, a partir del cromatograma de la muestra colectada a las 96 h del cultivo celular en condiciones de inducción (Figura 44B) se cuantificó la insulina glargina de cadena sencilla, según sección 6.5.5.4, y se obtuvo una concentración de 39.4 mg/L.

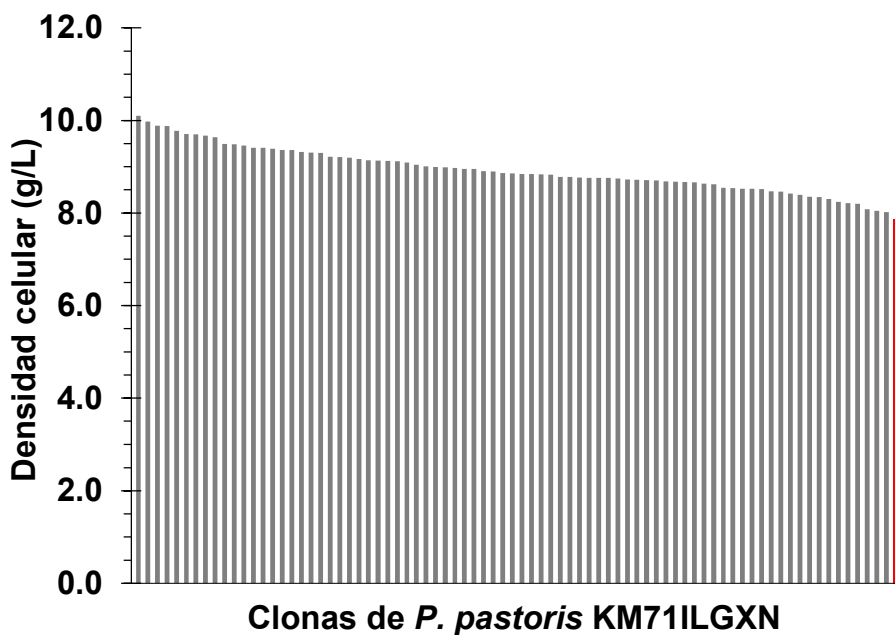
El pico correspondiente a la fracción mayoritaria de la cromatografía de fase reversa (Figura 44B) se colectó y analizó por un ensayo de espectrometría de masas para la identificación molecular. Este pico mostró tener una masa molecular de 6045.5005 Da (Figura 45A), mientras que la glargina comercial mostró una masa molecular de 6061.0005 Da (Figura 45B). La masa molecular teórica de la glargina de cadena sencilla calculada a partir de su secuencia de aminoácidos y teniendo en cuenta tres enlaces disulfuro es de 6044.97 Da, mientras que la masa molecular teórica de la glargina de cadena doble es de 6062.98 Da.



## 7.7 Cultivos en matraz bajo condiciones de inducción del gen heterólogo y selección de la cepa KM71ILGXN sobre-productora

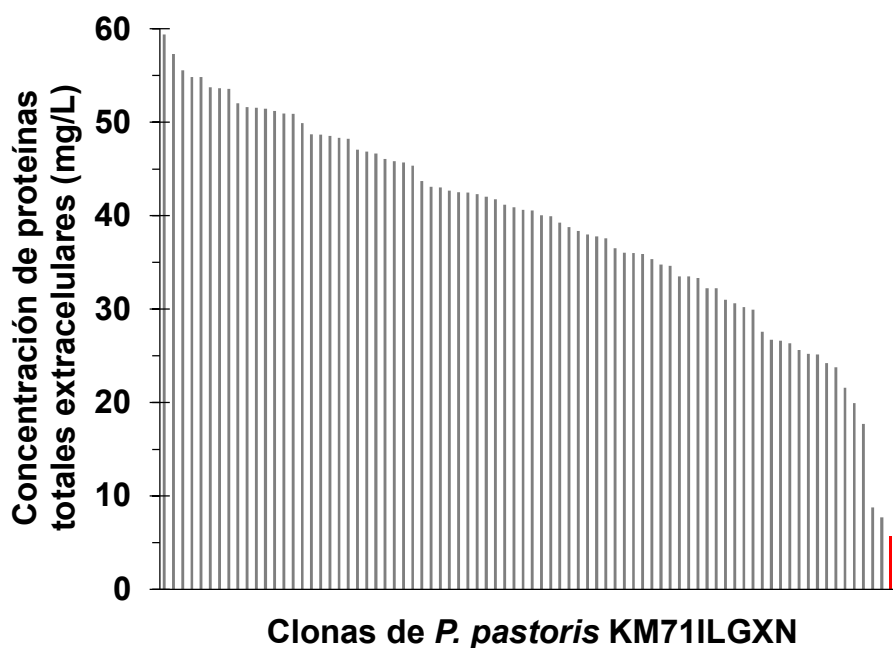
Para la selección de la cepa de *P. pastoris* KM71ILGXN sobre-productora se realizaron cultivos celulares en condiciones de inducción a 48 h (sección 6.5.6, Figura 18) para todas las clonas transformadas obtenidas. Se analizó la densidad celular, la concentración de proteínas totales extracelulares y el rendimiento de proteína extracelular/biomasa.

En la Figura 46 se muestra el resultado del crecimiento celular de las 80 clonas de *P. pastoris* KM71ILGXN. Los valores de la densidad celular a las 48 h de cultivo tuvieron valores entre 7.78 y 10.10 g/L. Los datos cumplen una distribución normal con una media de  $8.90 \pm 0.50$  g/L, y con un coeficiente de variación de 5.6%. En el anexo 11.4 se muestra el resultado del análisis estadístico. Además, los cultivos mostraron una  $DO_{600nm}$  final de  $38.5 \pm 2.7$ .



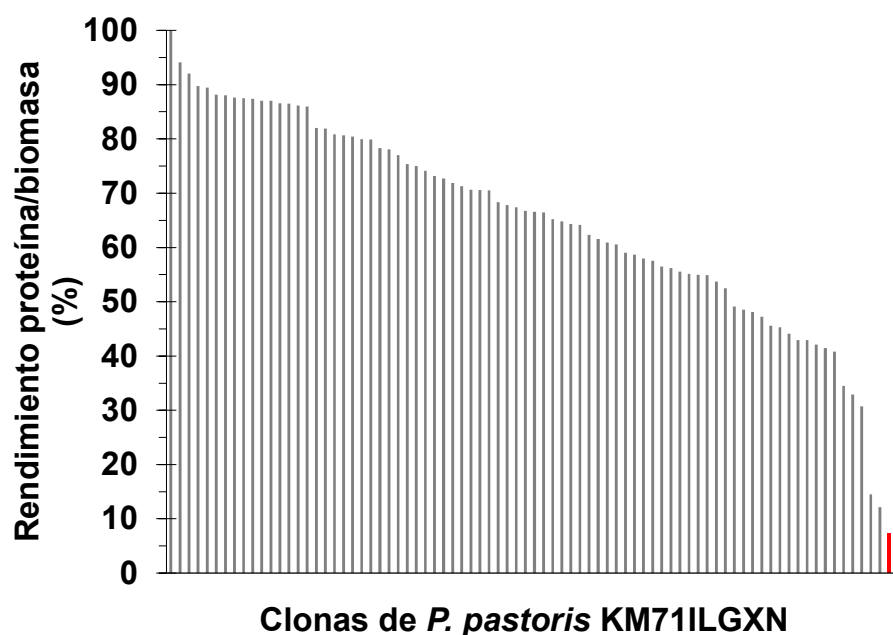
**Figura 46.** Crecimiento celular de las 80 clonas de *Pichia pastoris* KM71ILGXN. Las células se cultivaron en medio BMM con inducción (MeOH cada 12 h, 0.75% (v/v)) durante 48 h. Las barras se ordenaron de mayor a menor valor de la densidad celular. El dato de la columna roja (penúltima columna) corresponde a la cepa control (KM71pPIC9).

En la Figura 47 se muestra el resultado de los valores de la concentración de proteínas totales en el medio de cultivo libre de células, para las 80 clonas de *P. pastoris* KM71ILGXN evaluadas en medio BMM durante 48 h e inducción con MeOH. Los valores estuvieron entre 2.2-59.4 mg/L. Los datos no cumplen una distribución normal, el promedio fue de  $39.0 \pm 11.7$  mg/L con un coeficiente de variación de 30.1%. En el anexo 11.4 se muestra el resultado del análisis estadístico.



**Figura 47.** Concentración de proteínas totales extracelulares de las 80 clonas de *Pichia pastoris* KM71ILGXN. Las células se cultivaron en medio BMM con inducción (MeOH cada 12 h, 0.75% (v/v)) durante 48 h. Las barras se ordenaron de mayor a menor valor. El dato de la columna roja (penúltima columna) corresponde a la cepa control (KM71pPIC9).

Los valores del rendimiento de proteína extracelular/biomasa estuvieron entre 6.8 y 0.4 mg/g. Estos valores no cumplieron distribución normal. La media fue de  $4.4 \pm 1.3$  mg/g y un coeficiente de variación del 30%. En el anexo 11.4 se muestra el resultado del análisis estadístico. La Figura 48 muestra el rendimiento de proteína extracelular/biomasa normalizado para cada transformante de *P. pastoris* KM71ILGXN analizado

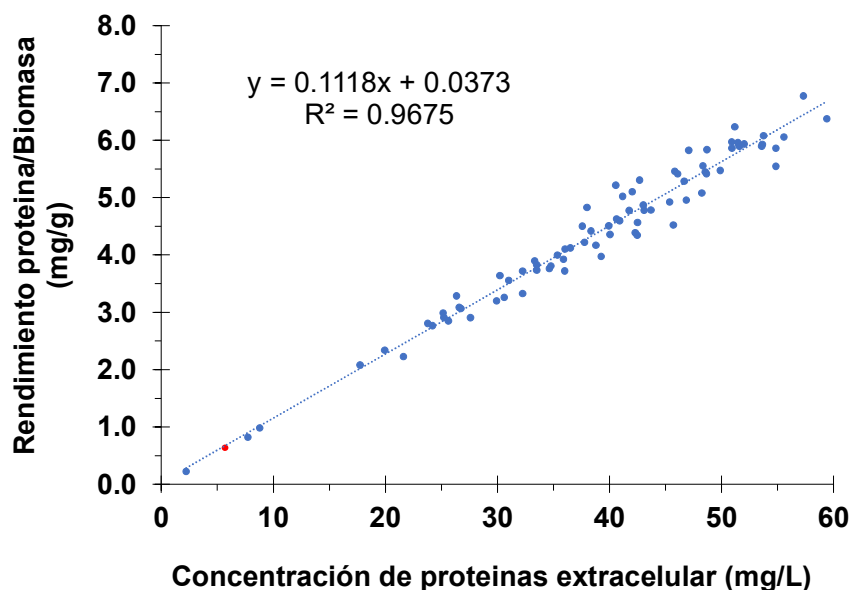


**Figura 48.** Rendimiento de proteína extracelular/biomasa de las 80 clonas de *Pichia pastoris* KM71ILGXN. Los valores están normalizado con respecto al valor de rendimiento más alto. Las células se cultivaron en medio BMM con inducción (MeOH cada 12 h, 0.75% (v/v)) durante 48 h. Las barras se ordenaron de mayor a menor valor. El dato de la columna roja (penúltima columna) corresponde a la cepa control (KM71pPIC9).

Solamente 3 (3.7%) de las 80 colonias se consideraron como cepas sobre-productoras. La mayoría de los transformantes (76, 92.6%) mostraron valores de rendimiento de proteína/biomasa normalizados entre 15 y 89% y solo una colonia estaba por debajo del 10%, excluyendo la cepa control negativo (*P. pastoris* KM71pPIC9). Estos dos últimos grupos de colonias se consideraron cepas intermedias y de baja producción. La cepa KM71ILGXN que produjo el mayor rendimiento de proteína/biomasa alcanzó 7.1 mg/g; 16.9 y 1.5 veces mayor que el rendimiento de proteína/biomasa de la cepa productora más baja y el valor promedio de las cepas productoras intermedias, respectivamente.

La concentración de proteínas totales extracelular para 16 clonas analizadas, con valores de rendimiento proteína extracelular/biomasa bajo, medio y alto (incluye las clonas de mínimo y máximo valor), fue proporcional a la concentración extracelular del precursor de insulina glargina determinado por RP-HPLC. La determinación se realizó a partir de la interpolación del área bajo la curva de cada fracción identificada como precursor de glargina, en cada uno de los cromatogramas de RP-HPLC obtenido y utilizando una curva patrón (sección 6.5.5.4). Así, se estimó que las concentraciones de insulina glargina de cadena sencilla de los 80 transformantes estaban en un rango entre 1.2 y 31.5 mg/L. La clona identificada como la de mayor rendimiento proteína/biomasa fue la colonia número 77 (*P. pastoris* KM71ILGXN Col.#77)

En la figura 49 se muestra un gráfico que relaciona los valores del rendimiento de proteína extracelular/biomasa en función de la concentración de proteínas totales en el medio de cultivo libre de células. Se observa una correlación lineal entre estas magnitudes, demostrando que fue correcto el análisis realizado para la selección de la clona sobre-productora.



**Figura 49.** Rendimiento de proteína extracelular/biomasa en función de la concentración de proteínas totales para las 80 clonas de *Pichia pastoris* KM71ILGXN. Los valores se organizaron de menor a mayor. El dato del punto rojo corresponde a la cepa control (KM71pPIC9).

Adicionalmente, las cinco clonas con los mayores valores de rendimiento proteína extracelular/biomasa se volvieron a ensayar en las mismas condiciones que se realizó la selección de la clona sobre-productora. Las siguientes tablas muestra los resultados del ensayo (Tabla 22).

**Tabla 22.** Resultados de la densidad celular al final del cultivo celular de *Pichia pastoris* KM71ILGXN para cinco clonas diferentes (Col.# 77, 70, 58, 63 y 9) y la determinación de concentración de proteínas totales extracelulares. Las células se cultivaron en medio BMM con inducción (MeOH cada 12 h, 0.75% (v/v)) durante 48 h. El experimento se realizó dos veces y se muestran los valores de cada réplica y el valor medio.

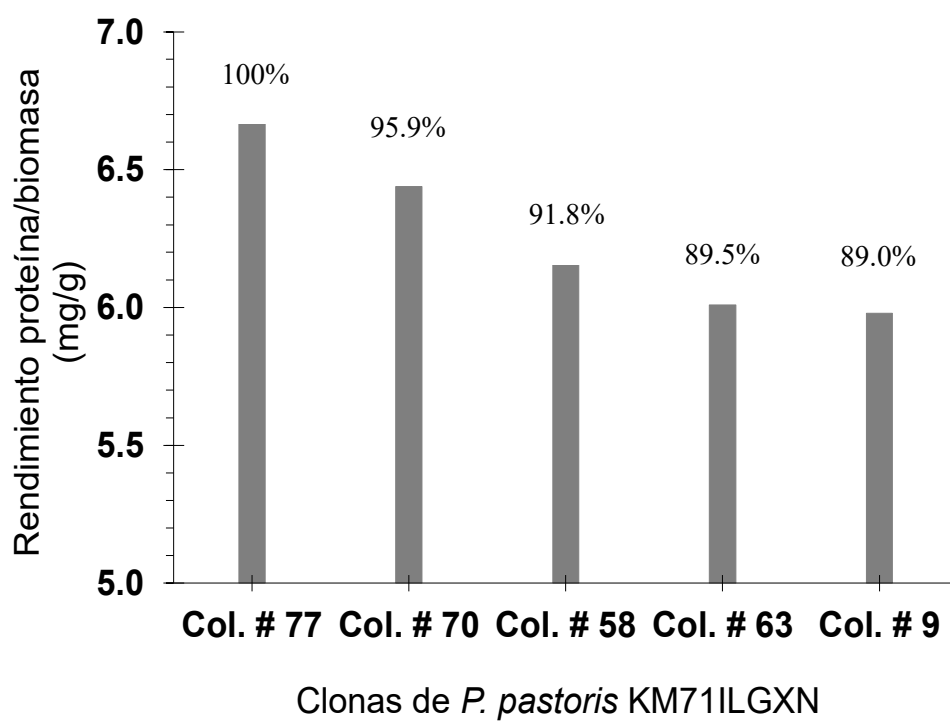
Clonas <i>P. pastoris</i> KM71ILGXN	Densidad celular al final del cultivo			Concentración de proteínas totales extracelular (mg/L)		
	Replica 1	Replica 2	Media *	Replica 1	Replica 2	Media
Col. # 77	9.0	9.7	9.3 ± 0.4	59.4	66.3	62.9 ± 3.5
Col. # 70	8.9	9.3	9.1 ± 0.2	57.3	60.3	58.8 ± 1.5
Col. # 58	8.6	9.8	9.2 ± 0.6	51.5	62.2	56.9 ± 5.4
Col. # 63	8.8	8.7	8.7 ± 0.01	51.6	53.3	52.5 ± 0.8
Col. # 9	8.8	9.6	9.2 ± 0.4	53.8	56.4	55.1 ± 1.3

\* Promedio de las desviaciones absolutas del valor medio.

Col.: colonia

La Figura 50 muestra los valores absolutos del rendimiento de proteínas extracelular/biomasa para las cinco clonas de *P. pastoris* KM71ILGXN seleccionadas anteriormente. Los valores absolutos del rendimiento proteína/biomasa estuvieron entre 6.0-6.7 mg/g. La clona *P. pastoris* KM71ILGXN Col.#77 resultó ser nuevamente la de mayor valor de rendimiento, por tanto, se seleccionó como la clona sobre-productora.

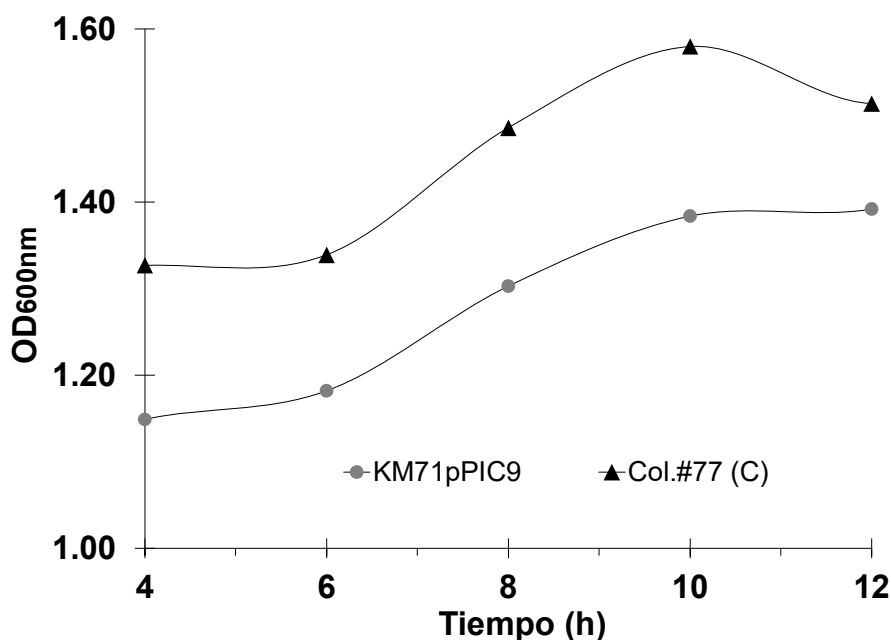




**Figura 50.** Rendimiento de proteína extracelular/biomasa de cinco clonas de *Pichia pastoris* KM71ILGXN (Col.#77, 70, 58, 63 y 9). Se muestran los valores absolutos. Las células se cultivaron en medio BMM con inducción (MeOH cada 12 h, 0.75% (v/v)) durante 48 h. Las barras se ordenaron de mayor a menor valor y se muestra el valor normalizado (%). Col.: colonia.

## 7.8 Cinética de crecimiento

Con el objetivo de evaluar el crecimiento celular durante la etapa de inducción del gen heterólogo de la clona seleccionada como sobre-productora (*P. pastoris* KM71ILGXN Col.#77), se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en matraz con agitación y se determinó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación. La siguiente figura (Figura 51) muestra la cinética de crecimiento.



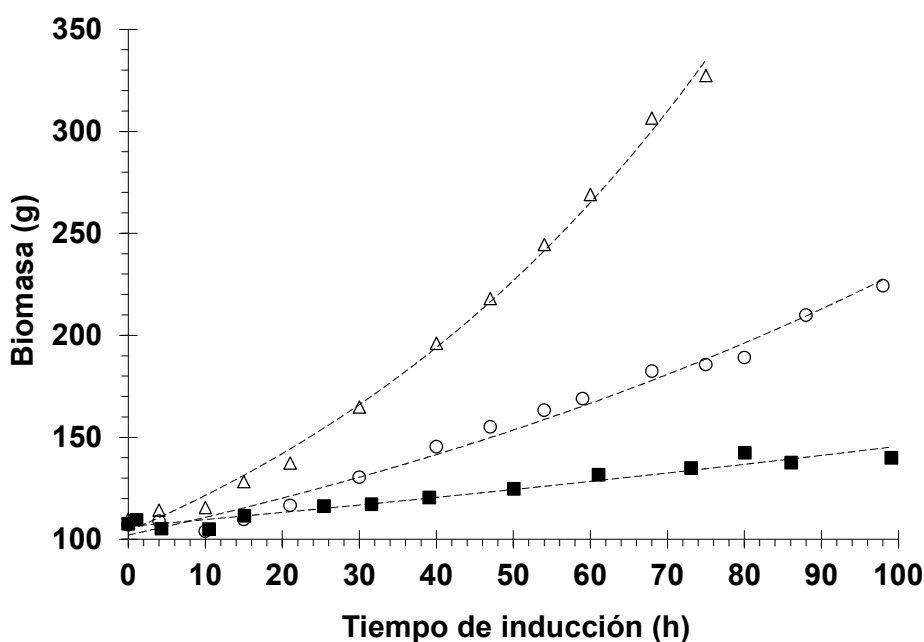
**Figura 51.** Cinéticas de crecimiento para KM71ILGXN Col.#77 y KM71pPIC9 en matraces de agitación. Cada punto fue analizado por cuatro réplicas (coeficiente de variación menor al 15%).

La cinética de crecimiento en los matraces de agitación para la cepa sobre-productora KM71ILGXN mostró un valor  $\mu$  de  $0.041 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$  y para la cepa control KM71pPIC9 el valor de  $\mu$  fue de  $0.039 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$ . Los resultados no mostraron diferencia significativa, con P-valor de 0.19.

## 7.9 Cultivos en biorreactor

Con el objetivo de evaluar los niveles producción del precursor de insulina glargina se llevaron a cabo experimentos con tres estrategias de cultivo a nivel de biorreactor (sección 6.6.1). Se consideraron como variables una alimentación limitada de metanol (MLFB) y alimentación no limitada de metanol (MNLFB) y la temperatura de 28°C y 24°C, durante la etapa de inducción con metanol. Los cultivos evaluados fueron MLFB a 28°C, MNLFB a 28°C y MNLFB 24°C.

Los tres cultivos en el biorreactor con la cepa sobre-productora KM71ILGXN Col.#77 mostraron un comportamiento en el crecimiento celular similar en la etapa de glicerol, alcanzando la concentración de densidad celular húmeda deseada ( $50.2 \pm 0.7$  gDCW/L) al finalizar la etapa de lote alimentado con glicerol. En la etapa de inducción, la biomasa aumentó exponencialmente ( $R^2 > 0.990$ ) para los tres cultivos (Figura 52), aunque se observaron diferentes constantes  $\mu$  (Tabla 23).



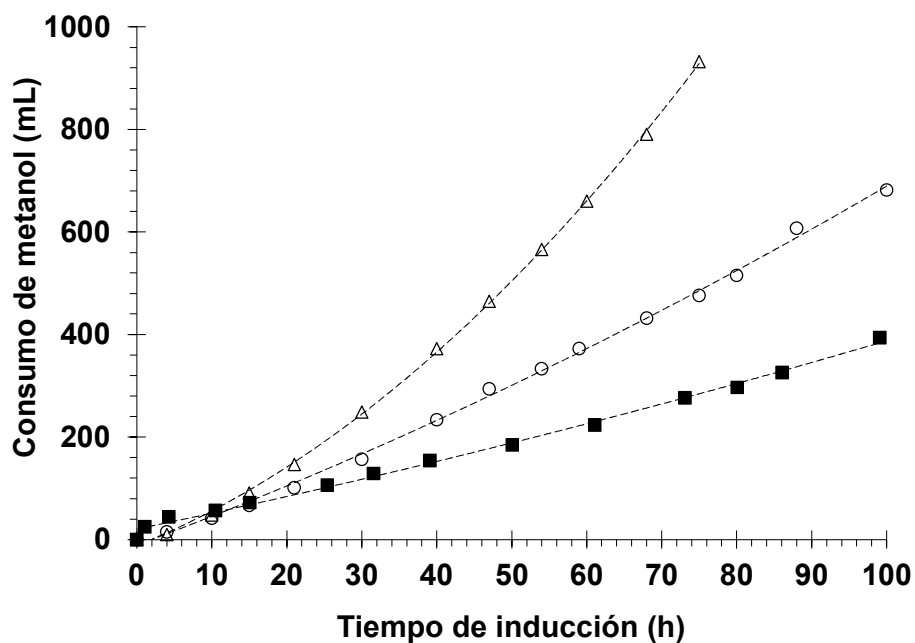
**Figura 52.** Cinética del crecimiento celular para los cultivos de *Pichia pastoris* KM71ILGXN Col. #77 Mut<sup>8</sup> para diferentes condiciones de cultivo. Cultivo MLFB a 28°C (■), cultivos MNLFB a 28°C (○) y 24°C (Δ).

**Tabla 23.** Parámetros de crecimiento y producción celular para los tres cultivos en biorreactor con la cepa sobre-productora *Pichia pastoris* KM71ILGXN Col.#77.

Cultivo	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) *	Producción volumétrica (mg/L)	$Q_p$ (mg/L h) *	$Y_{x/s}$ (g/g) *	$q_s$ (g/g h) *	$Y_{p/x}$ (mg/g)	$Y_{p/s}$ (mg/g) *	$q_p$ (mg/g h) *	Expresión de <i>KEX2</i> **
MLFB-28	0.0040 ± 0.0002	47.9 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.02	0.174 ± 0.010	0.021 ± 0.003	1.95 ± 0.10	0.272 ± 0.019	0.007 ± 0.001	----
MNLFB-28	0.0091 ± 0.0003	69.9 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.02	0.242 ± 0.006	0.037 ± 0.002	1.18 ± 0.06	0.235 ± 0.008	0.011 ± 0.001	0.54 ± 0.06
MNLFB-24	0.0164 ± 0.0003	121.8 <sup>c</sup>	1.47 ± 0.07	0.312 ± 0.005	0.053 ± 0.002	1.48 ± 0.07	0.456 ± 0.019	0.024 ± 0.002	0.95 ± 0.10

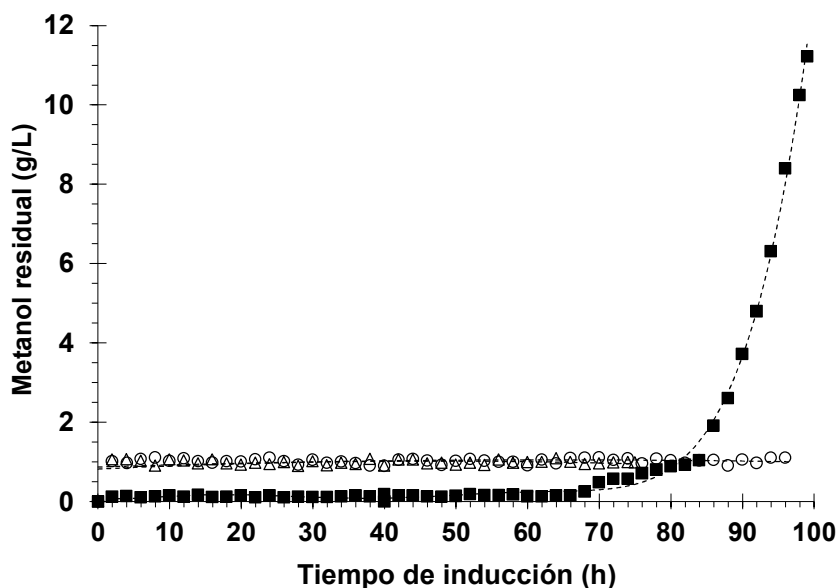
<sup>a</sup> 100 h de inducción. <sup>b</sup> 98 h de inducción. <sup>c</sup> 75 h de inducción. \*Datos ± error estándar estimado de la regresión lineal. \*\* Media para tres tiempos de inducción de un cultivo en estado cuasi-estacionario ± error estándar.  $Y_{p/x}$ , rendimiento de la producción extracelular de glargina/biomasa.  $Y_{p/s}$ , Rendimiento de la producción extracelular de glargina proveniente de metanol.  $Y_{x/s}$ , Rendimiento celular proveniente de metanol.

El consumo de metanol aumentó de acuerdo con un polinomio de segundo grado ( $R^2 > 0.995$ ), con una tasa de consumo de metanol (velocidad de alimentación de metanol) comenzando en 0.08 mL/min y alcanzando 0.07, 0.13 y 0.55 mL/min para el cultivo MLFB, y los cultivos de MNLFB a 28°C y 24°C, respectivamente (Figura 53).



**Figura 53.** Cinética del consumo de metanol para los cultivos celulares de *Pichia pastoris* KM71ILGXN Col.#77 Mut<sup>s</sup> para diferentes condiciones de cultivo. Cultivo MLFB a 28°C (■), cultivos MNLFB a 28°C (○) y 24°C (Δ).

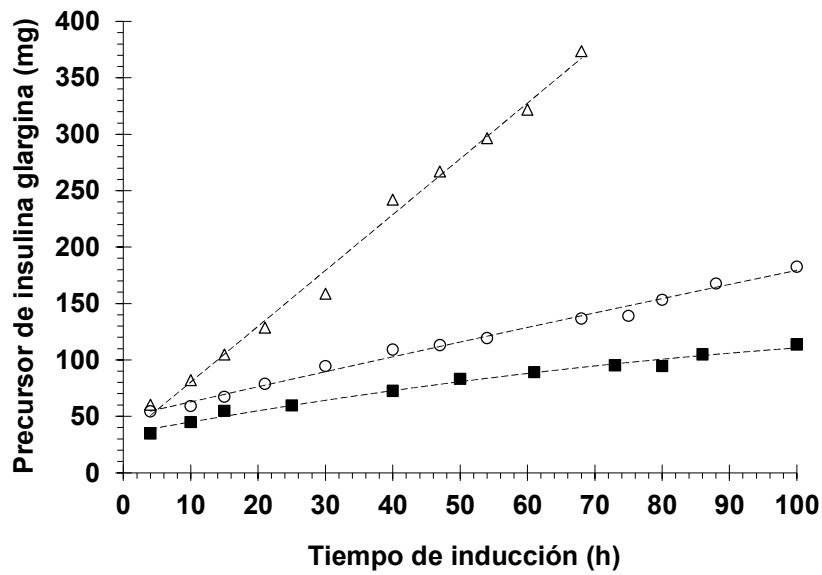
A diferencia de los cultivos de MNLFB, la concentración de metanol residual en el medio de cultivo para el cultivo de MLFB aumentó al final de la etapa de inducción (Figura 54).



**Figura 54.** Cinética del metanol residual para los cultivos celulares de *Pichia pastoris* KM71ILGXN Col.#77 Mut<sup>s</sup> para diferentes condiciones de cultivo. Cultivo MLFB a 28°C (■), cultivos MNLFB a 28°C (○) y 24°C (Δ).

$Y_{x/s}$  y  $q_s$  fueron constantes durante la etapa de inducción, aunque los valores fueron diferentes para cada cultivo (Tabla 23), siendo mayor en los cultivos MNLFB que en el cultivo MLFB y mayor en el cultivo MNLFB a 24°C, alcanzando 0.312 g/g y 0.053 g/gh.

La producción extracelular del precursor de insulina glargina aumentó linealmente ( $R^2 > 0.990$ ) en el cultivo de MNLFB a 28°C (Figura 55) con una productividad constante de 1.30 mg/h, alcanzando una producción volumétrica a las 100 h de inducción de 69.9 mg/L en el medio de cultivo (Tabla 23).



**Figura 55.** Cinética de la producción del precursor de insulina glargina para los cultivos celulares de *P. pastoris* KM71ILGXN Col.#77 Mut<sup>s</sup> para diferentes condiciones de cultivo. Cultivo MLFB a 28°C (■), cultivos MNLFB a 28°C (○) y 24°C (Δ).

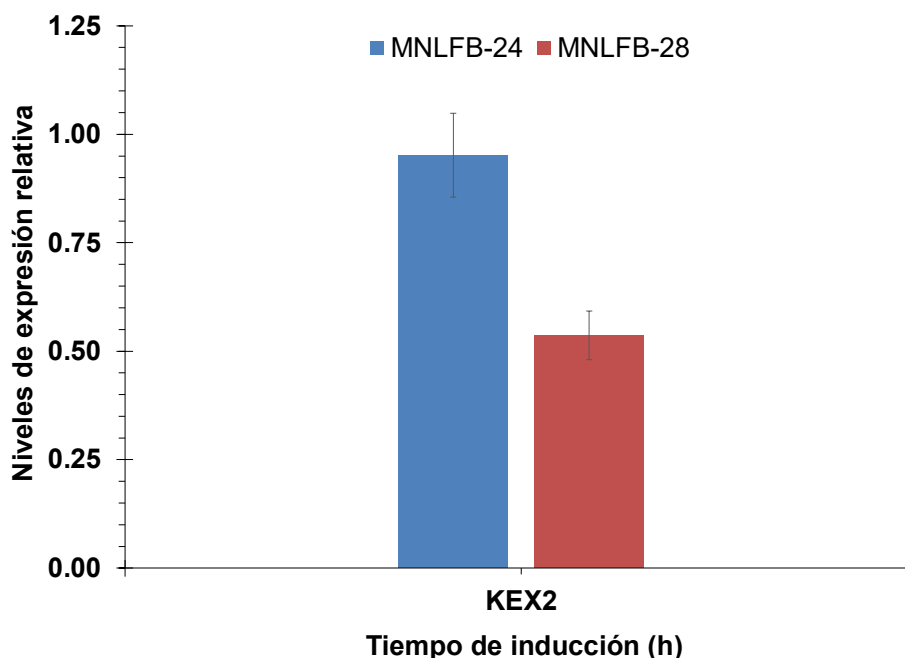
Por el contrario, para los cultivos MLFB y MNLFB a 24°C, el producto recombinante extracelular aumentó según un polinomio de segundo orden ( $R^2 > 0.986$ ), alcanzando una producción volumétrica a las 100 y 75 h de inducción de 47.9 y 121.8 mg/L de medio de cultivo, respectivamente para el tiempo y cultivo correspondientes (Tabla 23)

Por otra parte, para el cultivo MLFB, la productividad disminuyó de 15.9 a 47.9 mg/L, mientras que para el cultivo MNLFB a 24°C, la productividad aumentó de 22.5 mg/L to 121.8 mg/L (Tabla 23).  $Y_{p/x}$ ,  $Y_{p/s}$  y  $q_p$  fueron constantes durante la etapa de inducción, aunque los valores fueron diferentes para cada cultivo. Excepto para  $Y_{p/x}$ , los parámetros de producción ( $Q_p$ ,  $Y_{p/s}$  y  $q_p$ ) fueron más altos en los cultivos de MNLFB que en el cultivo de MLFB y más alto en el cultivo a 24°C. El mayor  $Y_{p/x}$  se alcanzó en el cultivo MLFB (Tabla 23).

### 7.10 Análisis de expresión del gen *KEX2*

El análisis de los niveles de expresión del gen *KEX2* se realizó debido al cuestionamiento de la correlación entre los niveles de expresión de dicho gen con respecto a los niveles de producción de la proteína recombinante precursor de insulina glargina para las dos condiciones de cultivo en MNLFB a 24°C y 28°C, respectivamente.

Los niveles de expresión del gen *KEX2* mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los cultivos MNLFB a 24 y 28°C. La figura 56 muestra que el nivel de expresión relativo para el cultivo MNLFB a 24°C fue de 0.95 y el de MNLFB a 28°C fue de 0.5. El análisis de expresión del gen *KEX2* de los cultivos de MNLFB reveló niveles 1.8 veces más altos para el cultivo a 24°C en comparación con el cultivo a 28°C (Tabla 23).

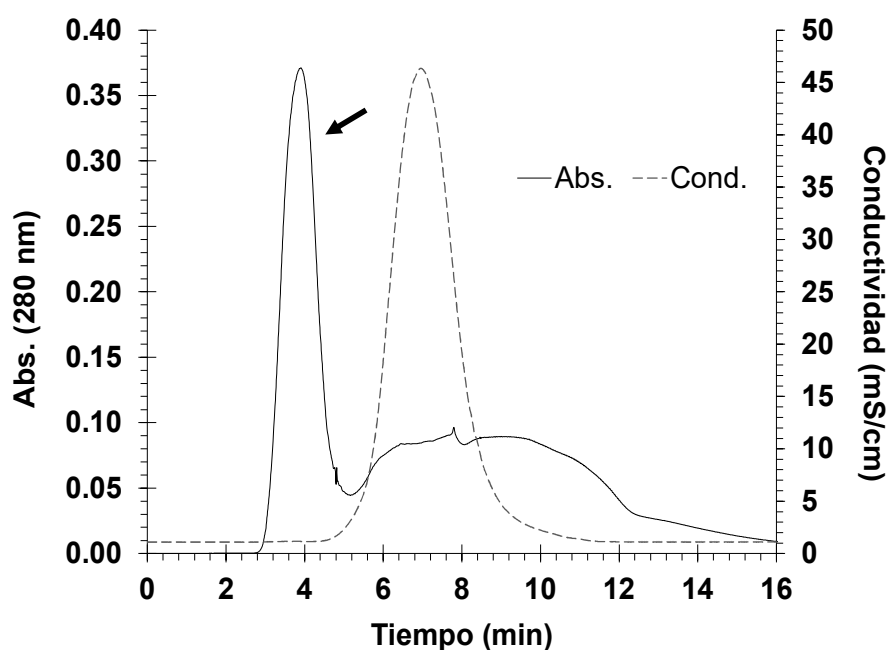


**Figura 56.** Comparación de los niveles de expresión relativo del gen *KEX2* en los cultivos MNLFB a 24 y 28°C. Los niveles de expresión a lo largo del tiempo de inducción fueron promediados para realizar la comparación.  $P \leq 0.05$ .



### 7.11 Purificación y caracterización del producto recombinante

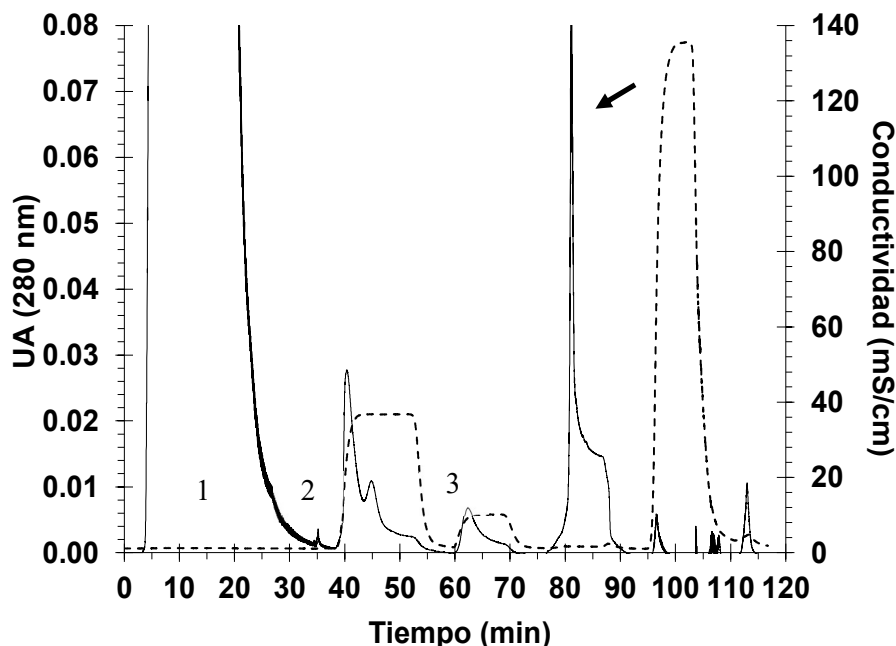
Para obtener un producto biotecnológico de esta naturaleza es necesario desarrollar un proceso de aislamiento y purificación de la proteína recombinante. En tal sentido se evaluaron métodos cromatográficos para la purificación de la proteína precursor de insulina secretada al medio de cultivo en la fermentación MNLFN-24°C. El sobrenadante libre de células se aplicó a una columna de filtración en gel para separar las proteínas del medio de cultivo (Figura 57) y obtener un material soluble en una solución tampón con baja conductividad.



**Figura 57.** Cromatografía de filtración en gel Sephadex G25 M, columna PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA). Se aplicó 1 mL del sobrenadante de cultivo libre de células de la fermentación MNLFB 24°C. La flecha muestra la fracción que corresponde a las proteínas eluidas de la columna, que se colectó en solución tampón acetato de sodio 100 mM pH 3.6. Abs.: Absorbancia, Cond: Conductividad.

El cromatograma muestra dos fracciones según el registro de absorbancia a 280 nm y conductividad. El pico eluido en la primera fracción (registro a 280 nm) se colectó. Posteriormente el material colectado se aplicó al siguiente paso cromatográfico, una columna de intercambio iónico.

El cromatograma de intercambio catiónico para la muestra de sobrenadante de cultivo libre de células, previamente desalado (Figura 58), mostró una primera fracción correspondiente al material no absorbido por la matriz cromatográfica. Seguidamente, dos picos pequeños en los pasos de lavado con NaCl 250 mM y con solución tampón acetato de sodio pH 5.6, respectivamente. La fracción a pH 8.0 mostró un pico alto y agudo y fue donde eluyó la proteína recombinante precursor de glargina.



**Figura 58.** Cromatograma de intercambio catiónico del medio de cultivo libre de células luego de un cambio de solución tampón. **1)** Fracción no absorbida a la matriz cromatográfica. **2)** Primer paso de lavado (tampón acetato de sodio 100 mM, pH 3.6, suplementado con NaCl 250 mM). **3)** Segundo paso de lavado (acetato de sodio 100 mM, pH 5.6). La flecha indica una única fracción donde eluyó el precursor de insulina glargina a pH 8.0.

El análisis en gel de SDS-PAGE de la fracción eluída de la cromatografía de intercambio catiónico reveló una única banda de 6 kDa (Figura 42, línea 3) y el RP-HPLC mostró un pico principal en un tiempo de retención correspondiente al precursor de insulina glargina (Figura 44C). Ambas técnicas analíticas indicaron que el producto eluido tuvo una pureza superior al 98%. El recobrado de la proteína recombinante fue del 20%.

## 7.12 Costos de la producción de insulina con el proceso desarrollado

Una vez desarrollado un proceso de producción, a escala de laboratorio, para obtener el precursor de insulina se procedió a realizar la estimación del costo de producción (Tabla 24).

**Tabla 24.** Costo de producción del precursor de insulina glargina con el proceso productivo desarrollado a escala de laboratorio.

Y <sub>p/s</sub>	Consumo de MeOH
0.456 g glargina/kg MeOH	2.19 kg MeOH/g glargina
↓	
Costo por materia prima (MeOH)	
0.84 USD/kg MeOH	1.84 USD/g glargina
↓	
Costo de producción	
Ajsute por purificación y otros factores	12.2 USD/g glargina

El rendimiento de la producción extracelular de glargina proveniente de metanol fue de 0.456 mg de glargina por gramos de metanol (Tabla 23), lo que equivale a 0.456 g glargina/kg de MeOH (Tabla 24). El inverso de este rendimiento ( $Y_{p/s}$ ) nos arroja que el consumo de metanol por unidad de masa de glargina fue de 2.19 kg de MeOH/g de glargina (Tabla 24). Teniendo en cuenta el costo de la materia prima de metanol en el mercado (0.84 USD/kg MeOH) se calculó que es el costo de este insumo por unidad de masa de glargina fue de 1.84 USD/g glargina (Tabla 24).

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se realizó una evaluación técnico-económica de un proceso productivo para obtener una proteína recombinante en una cepa de *P. pastoris* (sección 6.4.3). El análisis mostró que el costo de la materia prima metanol (inductor del gen *AOX*) es responsable del 70% del costo en la etapa de fermentación. De esta forma se estimó que el costo del proceso de fermentación por unidad de masa de glargina fue de 2.6 USD/g de glargina. Adicionalmente, se sabe que en un proceso productivo biotecnológico las etapas de aislamiento y purificación son responsables del

65-70% del costo total de producción, por tanto, se pudo estimar que el costo para el proceso productivo desarrollado fue de 6.1 USD/g de glargina. Por otra parte, el costo total directo de operación según las materias primas es el 50% del total del costo de operación (Figura 22). Por tanto, se estimó que el costo de producción fue de 12.2 USD/g de glargina (Tabla 24).

Seguidamente se procedió a estimar la capacidad productiva a escala industrial. El análisis se realizó de la siguiente forma: La producción volumétrica alcanzada fue de 121.8 mg de glargina por litro de cultivo (Tabla 23) y se estimó un 50% de recobrado total del proceso productivo, incluyendo las etapas de purificación (Tabla 25). Se calculó la producción del precursor de glargina usando un biorreactor de 6 m<sup>3</sup>, en un lote de proceso se obtienen 0.37 kg de glargina (Tabla 25). Para una capacidad productiva de 40 lotes al año se pueden fabricar 15 kg de glargina anualmente y esta cantidad satisface el 34% de la demanda anual del IMSS (Tabla 25, sección 7.1).

**Tabla 25.** Capacidad y costo de producción con el bioproceso desarrollado.

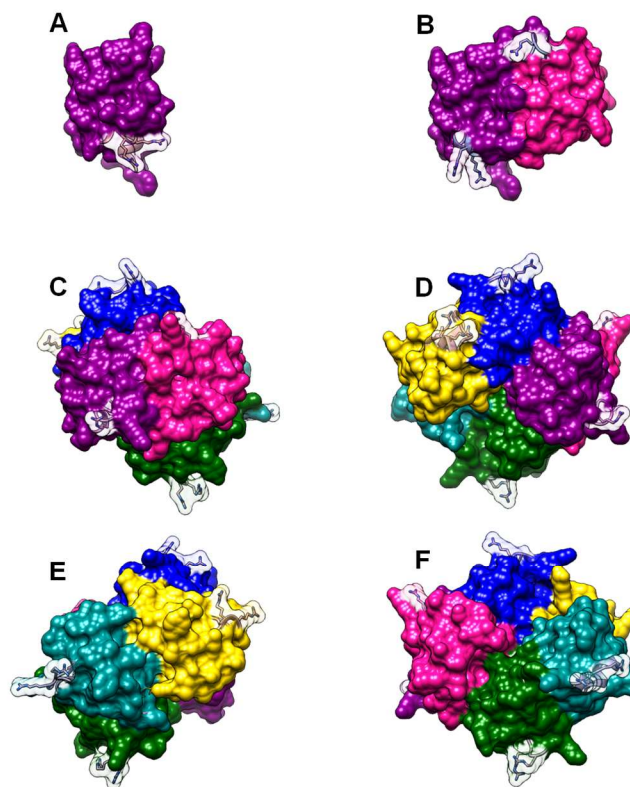
	Producción Volumétrica (mg/L)	Producción por Lote	Producción anual	Demanda anual del IMSS	Precio de glargina en el mercado	Costo de Producción
	121.8	6 m <sup>3</sup>	40 Lotes	43 kg	867 USD/g glargina	-
50% purificación	61	0.37 kg	15 Kg	Satisface el 34%	-	12.2 USD/g glargina

### 7.13 Modelos moleculares para la insulina glargina monocatenaria

Se demostró que el producto recombinante secretado al medio de cultivo fue la insulina glargina de cadena sencilla (precursor de insulina glargina), aun cuando la secuencia aminoacídica de la proteína recombinante satisface los criterios de un sustrato apropiado para la endo-proteasa Kex2. Esto sugirió que existía la dificultad del procesamiento del precursor de glargina intracelular por la proteasa Kex2. Un posible motivo podría ser que el sitio de corte de Kex2 al final de la cadena B del precursor de insulina glargina no estuviera accesible para la proteasa Kex2. Bajo estos criterios se construyeron modelos moleculares computacionales del homo-dímero y homo-hexámero de la insulina glargina monocatenaria.

Las estructuras proteicas 6INS y 1ZEI presentaron identidades de secuencia del 92% y 91%, respectivamente, con el precursor de insulina glargina monocatenaria. De esta forma se aseguró que dichas estructuras fueran plantillas adecuadas para construir modelos moleculares del precursor de insulina glargina (Figura 59) por modelaje por homología (Tress, 2013).

El monómero y todas las cadenas de los modelos de homo-dímero y homo-hexámero mostraron el plegamiento típico de insulina con 4-5 hélices alfa, cubriendo el 76-79% de la proteína, con los característicos tres enlaces disulfuro. En el modelo del homodímero, 13 residuos de una cadena interactúan con 14 residuos de la otra cadena a través de 8 enlaces de hidrógeno y 102 contactos no enlazantes. Entre los residuos de los sitios Kex2, Arg31 en la posición P2 de una cadena forma dos enlaces de hidrógeno con Arg22 y Glu21 de la otra cadena. En el modelo del homo-hexámero, 13-15 residuos de una cadena interactúan con 12-14 residuos de la otra cadena a través de 25 enlaces de hidrógeno, 402 contactos no enlazantes y un puente salino. Dos Arg31 en la posición P2 forman un enlace de hidrógeno con Glu21 de la otra cadena y un Arg31 forma un puente salino con Glu21 de la otra cadena.



**Figura 59.** Representación de superficie del precursor de insulina glargina monocatenario. **A)** Homodímero. **B)** Homo-hexámero. **C-F)** Los modelos moleculares de las figuras (A), (B) y (C) están en la misma vista, donde la interfaz de la cadena se coloca en el centro para el modelo homo-dímero. Las figuras (C), (D), (E) y (F) muestran el modelo del homo-hexámero rotado 90° en sentido horario consecutivamente desde un eje vertical en el plano de la imagen, para visualizar toda la superficie del homo-hexámero. En todos los modelos, las superficies en las posiciones P2P1 de los sitios Kex2 son transparentes para mostrar los aminoácidos Arg31-Arg32 de la cadena B del precursor de insulina glargina. Se utilizan diferentes colores para las cadenas siempre en el mismo orden: color púrpura oscuro, rosa intenso, verde oscuro, azul oscuro, amarillo y azul.

El análisis de accesibilidad para los residuos P4, P3, P2 y P1 de los sitios Kex2 mostró un 32, 14, 52 y 59% de accesibilidad para el sitio Kex2 en el modelo de monómero, mientras que un 43, 25, 49 y 65% de accesibilidad, y un 33, 54, 46 y 2% de accesibilidad para los dos sitios Kex2 en la estructura homodímera. Además, la accesibilidad de Arg en las posiciones P2 y P1 fue inferior al 19 y 53%, respectivamente, para los seis sitios Kex2 en el modelo homo-hexámero.

## 8 DISCUSIÓN

Se realizó un análisis financiero del comportamiento económico esperado para un proceso productivo para la obtención, a nivel de fermentación, de la insulina glargina. Algunos autores describen que la precisión de estos estimados está entre un 25-30% (Datar y Rosen, 1990). Existen trabajos precedentes donde se realizan estudios de factibilidad económica, pero analizando tecnología que emplean como hospedero células de *E. coli* (Petrides *et al.*, 1995). Sin embargo, en el caso específico de la propuesta que se realiza en este trabajo, la cual utiliza el modelo de expresión en *P. pastoris*, los estimados propuestos podrán ser útil como herramienta para la toma de decisiones estratégicas, con la posibilidad de producir este fármaco a partir de la integración de la ciencia y la tecnología en México.

De la Figura 20 se observa la variación del volumen de fermentación en función de la concentración de insulina glargina obtenida en el sobrenadante de cultivo celular de una fermentación con *P. pastoris*. A medida que aumenta la concentración de proteína glargina disminuye el volumen necesario de la fermentación para satisfacer la demanda del segmento del mercado seleccionado. Una buena correlación se observa para el caso de obtener una expresión de glargina de 3 g/L en cultivo de *P. pastoris* (Gurramkonda *et al.*, 2010) y una recuperación del 40%, considerando la purificación. Se estimó que para cubrir el segmento del mercado de insulina glargina por el IMSS y con una producción de 3 g/L a nivel de fermentación, sería necesario realizar 20 lotes de producción en un biorreactor de 3 m<sup>3</sup>, indicado por una flecha en la Figura 20. Al contrario, a medida que disminuye la concentración de la proteína de interés en el sobrenadante de cultivo celular entonces son necesarias más volumen de fermentación por lote y se necesita incrementar la cantidad de lotes de proceso.

La tendencia del gráfico, para las tres curvas, sigue una ecuación exponencial, del tipo  $y = \text{constante} \times e^{-0.788x}$ . Esta expresión muestra claramente la importancia del bioproceso para incrementar los niveles de producción de una proteína y con esto disminuir las cantidades de lotes de fermentación necesarios para cubrir la demanda nacional del IMSS de la insulina glargina.

Según estimaciones realizadas en este trabajo, el flujo de caja efectivo para la obtención de la insulina glargina evidencia que, a partir de seis años y medio de realizada

la inversión el valor del VAN es cero, lo cual indica que se ha recuperado el costo de la inversión (Figura 23, apéndice 11.3).

El análisis realizado hasta el momento y en estudios previos realizados con otras proteínas en nuestro laboratorio han, mostrado que la inversión inicial y la materia prima (glicerol y metanol) inciden en el 70% de los costos de operación. Sin embargo, en el caso de este modelo de estudio se requiere de un análisis más específico considerando un programa productivo más detallado que permita una aproximación objetiva del costo fijo de inversión y los costos de operación, para obtener un estado de resultados con aproximaciones certeras y que permitan las estimaciones de los parámetros económicos que determinaran la factibilidad económica del proyecto. En cuanto a la factibilidad técnica, con la definición del segmento de mercado abordada, fue posible determinar la escala de demanda del proceso, la cual se acota a una escala técnicamente factible de operar.

Hoy día las proteínas terapéuticas recombinantes son indispensables para el tratamiento eficaz de muchas enfermedades. Estos productos biológicos son cada vez más valorados debido a su alta especificidad y sus limitados efectos adversos (Well y Robinson, 2017). En las últimas décadas se ha desarrollado la industria biotecnológica. Esto ha permitido la producción de enzimas industriales y proteínas biofarmacéuticas (Weinacker *et al.*, 2013). En el caso específico de México muchos de los productos biotecnológicos que se comercializan en el país son importados. Por tanto, es importante desarrollar esta industria para satisfacer las necesidades crecientes en el sector salud (Gómez y Rodríguez, 2008). En este sentido va enfocado el presente trabajo, la obtención de la insulina glargina recombinante.

El promedio de la dosis diaria de insulina para un paciente es de 40-60 unidades internacionales (equivalente a 1.4-2.1 mg). Para el año 2000 se estimó necesario producir 7000 kg de insulina para satisfacer la demanda mundial de este fármaco (Kjeldsen *et al.*, 2001). Nuestro análisis indicó que la demanda anual en México para la insulina glargina fue de 43 kg en el 2016, según datos del IMSS (Tabla 20). Se sabe que 150 g de insulina puede purificarse de un páncreas porcino (Kjeldsen, 2000), lo cual no satisface los requerimientos del mercado. Estas cantidades solo son posible de obtener por vía recombinante.



El primer producto recombinante aprobado por la FDA fue la insulina. En este caso se utilizó el microorganismo *E. coli* transformado con ADN humano recombinante para expresar la insulina, que fue aislada, re-naturalizada y purificada (Leader *et al.*, 2008). La bacteria *E. coli* ha sido usada como una plataforma versátil para la expresión de proteínas recombinantes (Wong *et al.* 2018). Sin embargo, este sistema tiene limitaciones, por ejemplo, la formación de cuerpos de inclusión intracelulares. Por lo tanto, pasos adicionales son necesarios realizar para la desnaturalización y renaturalización de la molécula. Así, las estrategias de purificación encarecen el proceso productivo. Además, este sistema de expresión carece de la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales complejas (Ferrer-Mirallès *et al.*, 2009). Estas limitaciones, y otras, han sido superadas al emplear sistemas de expresión eucarióticos. La levadura metilotrófica *Pichia Pastoris* es parte de un sistema de expresión donde cientos de proteínas heterólogas han sido expresadas con éxito (Cregg *et al.*, 2018). Por tal motivo, en este trabajo se seleccionó *P. pastoris* KM71 como microorganismo modelo para la obtención de la insulina glargina.

En este trabajo se definió la secuencia nucleotídica del gen sintético codificante del precursor de insulina glargina (Figura 24B). Esta secuencia de ácidos nucleicos (*ILGXN*) se optimizó según codones preferencias para la expresión en *P. pastoris* (Sreekrishna y Kropp, 1996). Trabajos previos han utilizado la estrategia de optimización de los codones (Viader-Salvado *et al.*, 2010; Gurramkonda *et al.*, 2010; Viader-Salvado *et al.*, 2013), lo cual podría mejorar la producción de las proteínas recombinantes. El gen sintético *ILGXN* se clonó en marco con la secuencia señal del factor alfa de apareamiento de *S. cerevisiae* en el vector integrativo pPIC9 de *P. pastoris* (Figura 24B). En este sistema clásico de secreción de proteínas heterólogas la endo-proteasa Kex2 es responsable de eliminar la secuencia del factor alfa y así recuperar la proteína recombinante en el medio de cultivo. En nuestro diseño de la construcción del casete de expresión (Figura 24B) se observa que, justo antes del primer aminoácido B1 de la secuencia aminoacídica de la glargina, se encuentra un sitio (Lys-Arg) potencialmente de corte de la endo-proteasa Kex2. Esto es particularmente importante para que la secreción del producto recombinante se realice de manera eficiente, especialmente valiosa en productos de tamaños moleculares menores a 10 kDa (Sreekrishna y Kropp, 1996). Normalmente, al sitio de ruptura Lys-Arg preceden

los residuos de aminoácidos del péptido espaciador Glu-Ala-Glu-Ala, que es importante para un procesamiento proteolítico eficaz de Kex2 (Sreekrishna y Kropp, 1996). Sin embargo, en este estudio se eliminó la secuencia del péptido espaciador (repeticiones de Glu-Ala) e incluso así se secretó el precursor de insulina glargina en el medio de cultivo. En otros trabajos se han desarrollado enfoques similares, aunque con otros modelos de proteínas (Eurwilaichitr et al., 2002; Guerrero-Olazarán *et al.* 2010).

En el presente estudio se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris* KM71ILGXN Mut<sup>s</sup> para producir y secretar la insulina glargina como un polipéptido extracelular de 52 residuos de aminoácidos. Después de la transformación de la cepa de *P. pastoris* KM71, se cribaron 80 colonias recombinantes para seleccionar la cepa transformada que produzca la mayor cantidad de proteína recombinante. La selección del clon de levadura recombinante después de la transformación es un paso crítico en el desarrollo de cultivos de biorreactores. Para *P. pastoris*, se entiende por variación clonal, la variación en los niveles de producción de la proteína heteróloga entre cada una de las clonas obtenidas como resultado de la transformación con el casete de expresión e integración en el genoma del hospedero (Aw *et al.*, 2017).

Debido a lo anterior, se requiere un cribado para seleccionar un transformante con altos niveles de producción de la proteína heteróloga (Looser *et al.*, 2015). Varios estudios han intentado explicar la variación clonal (Viader-Salvadó *et al.*, 2006; Schwarzhans *et al.*, 2016). El aumento del número de copias del gen heterólogo se ha descrito como la principal influencia en la variación clonal, además de otros factores como son el lugar del sitio del locus de integración, reordenamientos genómicos, deleciones o polimorfismos de un solo nucleótido (Vogl *et al.*, 2018). En el presente trabajo, después de 48 h de inducción con metanol en matraces agitados, las 80 transformantes de *P. pastoris* evaluadas mostraron diferentes valores para su rendimiento de proteína/biomasa extracelular (Figura 47), lo que indica claramente el impacto de la variación clonal en la producción de proteína extracelular. Además, solo el 3.7% de los transformantes se consideraron cepas sobre-productoras, lo que revela la importancia del proceso de selección para maximizar la producción de proteínas por las células de levadura.

Numerosos estudios han demostrado la utilidad de *P. pastoris* para la producción de precursores de insulina humana y sus análogos utilizando cepas Mut<sup>+</sup> o Mut<sup>s</sup> (País *et al.*,

2003; País-Chanfrau *et al.*, 2004; Mansur *et al.*, 2005; Polez *et al.*, 2016; Thongyoo *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2008; Gurramkonda *et al.*, 2010; Sreenivas *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). En un trabajo anterior, se mostró la eficiencia de las cepas de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> para producir y secretar en el medio de cultivo fitasas beta con estructura de hélice con las secuencias amino-terminales correctas de la remoción de la región pro del factor alfa por la proteasa Kex2 (Viader-Salvadó *et al.*, 2010). Además, una disminución de la temperatura a 24°C en la etapa de inducción condujo a un aumento en la secreción de fitasa en cultivos en biorreactores (Viader-Salvadó *et al.*, 213). Aunque se probaron temperaturas más bajas de hasta 15°C, se obtuvo un mayor rendimiento de producción de fitasa extracelular ( $Y_{p/x}$ ) en el cultivo a 24°C en la etapa de inducción. Además, el análisis de expresión del gen *KEX2* mostró un incremento en los niveles de expresión durante la etapa de inducción a 24°C (Castillo, 2014). En conjunto, estos resultados indicaron que la proteasa Kex2 probablemente tiene una alta actividad en las cepas KM71 Mut<sup>s</sup> cuando crece en metanol a 24°C. Por lo tanto, en este trabajo, diseñamos cepas de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> para producir y secretar la insulina glargina mediante la ruptura en dos sitios Kex2. Se decidió utilizar una cepa Mut<sup>s</sup> porque este fenotipo consume menos oxígeno y metanol en comparación con el fenotipo Mut<sup>+</sup>. Además, la temperatura, la concentración de metanol y el oxígeno disuelto del cultivo se pueden controlar más fácilmente, lo que facilita el escalamiento del cultivo (Viader-Salvadó *et al.*, 2013). Sin embargo, los análisis de SDS-PAGE, RP-HPLC y EM mostraron que el producto recombinante obtenido fue la insulina glargina de cadena sencilla (precursor de glargina) en lugar de la glargina de cadena doble, como se esperaba.

Las cepas KM71ILGXN se construyeron para producir la insulina glargina monocatenaria fusionada con la secuencia pre-pro del factor alfa. La secuencia del factor alfa pre-pro/glargina tiene dos sitios de reconocimiento de Kex2, uno de los cuales está al final de la señal pre-pro del factor alfa (Leu-Glu-Lys-Arg ↓ Phe) y el otro está al final de la cadena-B de la glargina (Lys-Thr-Arg-Arg ↓ Gly) como se muestra en la figura 24B.

Los residuos en las posiciones P1, P2, P4 y P1' son críticos para la hidrólisis eficaz del sustrato por la proteasa Kex2 (Yang *et al.*, 2013; Rockwell *et al.*, 2002; Rockwell y Thorner, 2004). La proteasa Kex2 rompe específicamente en el extremo C-terminal de los residuos de aminoácidos dibásicos Lys-Arg/Arg-Arg con una diferencia insignificante

para Lys o Arg en la posición P2 (Rockwell *et al.*, 2002; Rockwell y Thorner, 2004). Además, la proteasa Kex2 exhibe un reconocimiento dual para residuos básicos o alifáticos en la posición P4 (Rockwell *et al.*, 2002). En este trabajo, se produjo y se secretó la insulina glargina monocatenaria en el medio de cultivo, lo que indica que la proteasa Kex2 removió eficazmente la región del pro-péptido del factor alfa. No obstante, aunque el sitio de ruptura de Kex2 al final de la secuencia de la cadena-B de la glargina satisface los criterios para un sustrato apropiado para la proteasa Kex2, la glargina de cadena sencilla no se cortó. La necesidad de sobre-expresar Kex2 para aumentar la relación Kex2/glargina monocatenaria ha sido propuesta en la literatura (Sreenivas *et al.*, 2015) para mejorar el procesamiento de la glargina monocatenaria por la proteasa Kex2. Sin embargo, en el presente trabajo, el análisis mediante RP-HPLC de cultivos en matraces agitados con las cepas no sobre-productoras e incluso en momentos tempranos en la cinética de crecimiento donde la producción de glargina era baja, siempre indicó la presencia exclusiva de la glargina monocatenaria en el medio de cultivo libre de células. Esto sugiere que la dificultad del procesamiento intracelular de la glargina de cadena simple por la proteasa Kex2 no está correlacionada con la relación Kex2/glargina de cadena simple, y el sitio de ruptura de Kex2 al final de la cadena-B de glargina pudiera no estar tan accesible para la proteasa Kex2, como lo está el sitio de ruptura Kex2 al final del pre-pro-péptido del factor alfa. Recientemente, se describió que, aunque la tanasa de *Aspergillus niger* GH1 recombinante producida en *P. pastoris* tiene dos sitios de reconocimiento de Kex2, uno de ellos no fue procesado por la proteasa Kex2, porque no estuvo expuesto en la superficie de la proteína (Fuentes-Garibay *et al.*, 2015). Sin embargo, el modelo molecular de insulina glargina monocatenaria (Figura 59A) mostró que la accesibilidad de los residuos P2 y P1 en el sitio de reconocimiento de Kex2 es mayor del 51% y mayor del 58%, respectivamente.

Por otro lado, una propiedad importante de la insulina es su capacidad para asociarse en dímeros y hexámeros a través de interacciones hidrofóbicas en el extremo C-terminal de la cadena B (Hilgenfeld *et al.*, 2014; Dodson y Steiner, 1998). Además, se ha sugerido que ocurre una auto asociación de la insulina durante su producción en levaduras, lo que facilita su transporte a través de la vía secretora (Kjeldsen y Pettersson, 2003). Por lo tanto, dado que el sitio de ruptura Kex2 de la glargina monocatenaria también se encuentra al

final de la cadena-B, en las formas diméricas o hexamérica de la glargina monocatenaria ensambladas intracelularmente en la célula huésped, el sitio de ruptura Kex2 podría estar oculto y difícil de acceder por la proteasa Kex2 en el aparato de Golgi.

Los modelos moleculares del homo-dímero (Figura 59B) y homo-hexámero (Figura 59C-F) de la insulina glargina monocatenaria corroboraron esta hipótesis, con una Arg muy oculta en la posición P1 (2% de accesibilidad) para una de las subunidades y una Arg aún más oculta en la posición P2 para las dos subunidades del modelo del homo-dímero, en comparación con el modelo del monómero (49% y 46% frente a 52% de accesibilidad). De manera similar, se observó una Arg muy oculta en las posiciones P2 y P1 para los seis sitios Kex2 del modelo del homo-hexámero, en comparación con el modelo de monómero (<19% y <53% frente a 52% y 59% de accesibilidad, respectivamente).

Se utilizó una estrategia de modelado por homología con el servidor SWISS-MODEL para construir los modelos moleculares de homo-dímero y homo-hexámero de la insulina glargina de cadena simple, ya que a menudo se conservan las superficies de interacción proteína-proteína en complejos homólogos. Además, las plantillas están disponibles para la mayoría de las interacciones proteína-proteína conocidas. SWISS-MODEL está constantemente clasificado entre los mejores servidores de modelado en el proyecto de Evaluación Continua de Modelos Automatizados (CAMEO) y, junto con el servidor Robetta, son los únicos servidores participantes en el proyecto CAMEO que proporcionan resultados para objetivos oligoméricos (Waterhouse *et al.*, 2018).

Las estrategias para mejorar la eficiencia de la proteasa Kex2 “*in vivo*” pueden implicar el aumento de la expresión del gen *KEX2* y/o la optimización del sitio de ruptura del sustrato. Se ha mejorado la producción de muchas proteínas recombinantes optimizando el residuo del sitio P1' para Kex2 (Yang *et al.*, 2013) o integrando copias adicionales del gen *KEX2* en el genoma de *P. pastoris*. La proteína IFN $\alpha$ -2a se procesó correctamente a partir de su precursor en *Hansenula polymorpha* solo después de que el gen *KEX2* derivado de *S. cerevisiae* se co-expresara con el gen heterólogo (Müller-II *et al.*, 2002). De manera similar, la co-expresión de una versión truncada del gen *KEX2* permitió el procesamiento correcto del precursor de la lipasa *Rhizopus oryzae* en

*S. cerevisiae* (Takahashi *et al.*, 2000) y la producción de insulina glargina de doble cadena en *P. pastoris* (Sreenivas *et al.*, 2015). Los resultados del análisis de expresión del gen *KEX2* para cultivos de MNLFB mostraron que el cultivo a 24°C en la etapa de inducción tenía una expresión del gen *KEX2* 1.8 veces mayor que el cultivo a 28°C. Sin embargo, la proteasa Kex2 endógena producida por las células de levadura no pudo romper el sitio Kex2 de la insulina glargina de una cadena. En la versión truncada de la proteasa Kex2 utilizada para procesar el precursor de la lipasa de *R. oryzae* (Takahashi *et al.* 2000) o producir la insulina glargina de doble cadena (Sreenivas *et al.*, 2015) se eliminó el dominio transmembranal y una región del extremo C-terminal, y se mantuvo su péptido señal nativo. Por lo tanto, la proteasa Kex2 truncada se produjo y secretó al medio de cultivo como una proteasa soluble (Takahashi *et al.* 2000; Brenner y Fuller, 1992), donde la baja concentración del producto recombinante en el medio de cultivo podría favorecer la formación de los monómeros (Kjeldsen y Pettersson, 2003) y por tanto el procesamiento de la glargina de una cadena. En nuestro trabajo, aunque la expresión del gen *KEX2* endógeno se incrementó, la proteasa Kex2 permaneció intracelularmente como una proteína transmembranal en la red trans-Golgi, donde la formación de homo-dímeros y homo-hexámeros es más probable, desfavoreciendo el procesamiento de la glargina monocatenaria.

Respecto a los cultivos en el fermentador evaluados con la cepa sobre-productora no solo se buscó determinar condiciones de cultivo que permitiera una alta producción de la insulina glargina en *P. pastoris*, sino que también se contribuyera a la comprensión del impacto de las condiciones de cultivo en la fase del lote alimentado con metanol en términos de respuesta fisiológica celular y su correlación con los parámetros de producción. A pesar del uso frecuente de *P. pastoris* para la producción de proteínas heterólogas, la relación de los datos fisiológicos con los resultados de la producción de proteínas aún no se ha realizado de manera integral. Se ha descrito que varios factores ambientales, como la estrategia de alimentación con metanol y la temperatura del medio durante la etapa de inducción, entre otros, afectan la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* (Cos *et al.*, 2006; Losser *et al.*, 2015; Dragosits *et al.*, 2009; Viader-Salvadó *et al.*, 2013). Por lo tanto, se evaluó el efecto de la estrategia de alimentación con metanol (MLFB vs. MNLFB) y la temperatura de inducción (28 vs 24 °C) sobre el crecimiento

celular y los parámetros de producción extracelular de insulina glargina de una cadena en cultivos de biorreactores. En un trabajo previo se describió una temperatura óptima de 24°C en la etapa de inducción para maximizar el rendimiento de producción de fitasa extracelular ( $Y_{p/x}$ ) utilizando una estrategia MNLFB con una cepa de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> productora de fitasa (Viader-Salvadó *et al.*, 2013). Por lo tanto, en el presente trabajo se decidió probar la temperatura de inducción de 24°C con la cepa de *P. pastoris* KM71 Mut<sup>s</sup> productora de la insulina glargina monocatenaria. En el cultivo MLFB, el metanol se alimentó a una velocidad que aumentó exponencialmente; mientras que en los cultivos de MNLFB, las células demandaron metanol según lo requerido para mantener una concentración constante de metanol de 1 g/L en el medio de cultivo, lo que provocó que la velocidad de alimentación de metanol en el cultivo MLFB aumentara linealmente (es decir, se agregó metanol de acuerdo con una ecuación de un polinomio de segundo grado). Para la estrategia MNLFB aplicada a las cepas Mut<sup>s</sup>, fue suficiente con solo una simple estrategia de control on-off integrada en un sistema de control de circuito cerrado para mantener una concentración constante de metanol en el medio de cultivo (Viader-Salvadó *et al.*, 2013b). Para el cultivo MLFB, se aplicó una estrategia de perfil de velocidad de alimentación de metanol exponencial, la cual es una estrategia bien conocida para las cepas Mut<sup>+</sup>. El perfil se obtiene a partir de ecuaciones de balance de masa para mantener constante  $\mu$  (Looser *et al.*, 2015; Barrigón *et al.*, 2013). Para el caso del cultivo MNLFB, en el que se utilizó un sistema de control de circuito cerrado con un sensor de metanol para mantener una concentración de metanol constante en el medio de cultivo, el cual también es una estrategia bien conocida para las cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>s</sup> (Barrigón *et al.*, 2013; Viader-Salvadó *et al.*, 2013b). A pesar de los diferentes perfiles de alimentación de metanol en las dos estrategias usadas para la alimentación del metanol, en los tres cultivos se observó un crecimiento exponencial a una  $\mu$  constante, siendo mayor en la estrategia MNLFB que en la MLFB a 28°C (0.009 vs 0.004 h<sup>-1</sup>) e incluso mayor en el cultivo de MNLFB a 24°C que a 28°C en la etapa de inducción (0.016 vs 0.009 h<sup>-1</sup>). Además, el ajuste matemático del gráfico de biomasa en función del tiempo mostró un coeficiente R<sup>2</sup> más alto para los cultivos MNLFB a 28°C o 24°C que para el cultivo MLFB (0.984 y 0.997 vs 0.948). El menor valor de R<sup>2</sup> en el cultivo MLFB, en comparación con los cultivos MNLFB, se correlacionó con la acumulación de metanol en el medio de cultivo

que se observó después de 80 h de inducción en el cultivo MLFB (Figura 54), alcanzando finalmente niveles tóxicos. También se ha informado en la literatura sobre una acumulación similar de metanol en un cultivo MLFB (D'anjou y Daugulis, 2001; Charoenrat *et al.*, 2015).

Los resultados sobre los parámetros productivos indicaron que  $Q_p$  y  $q_p$  se correlacionaron directamente con el valor  $\mu$ . Conocer la relación entre  $q_p$  y  $\mu$  es esencial para maximizar  $q_p$ . Para las cepas  $Mut^+$ , la relación  $q_p(\mu)$  muestra un  $q_p$  máximo en un valor de  $\mu$  óptimo entre  $0.010$ - $0.016\text{ h}^{-1}$  (Looser *et al.*, 2015; Potgieter *et al.*, 2010), incluso para la producción de un precursor de insulina (Hang *et al.* 2008). Para las cepas  $Mut^s$ , se sabe poco acerca de esta correlación, pero el valor  $\mu$  para el cultivo de MNLFB a  $24^\circ\text{C}$  estuvo cerca del valor de  $\mu$  óptimo para las cepas  $Mut^+$ . Además, el  $Q_p$  más alto también se alcanzó en el cultivo de MNLFB a  $24^\circ\text{C}$ , lo cual está en concordancia con resultados descritos anteriormente, ya que el valor  $\mu$  para el cultivo de MNLFB a  $24^\circ\text{C}$  estuvo en el rango del valor de  $\mu$  óptimo que se reportó para la máxima productividad extracelular de fitasa utilizando una cepa de *P. pastoris* KM71  $Mut^s$  (Viader-Salvadó *et al.*, 2013b). El valor  $\mu$  para el cultivo de MNLFB a  $24^\circ\text{C}$  fue mayor que los reportados por otros autores para una cepa  $Mut^s$  con una estrategia de alimentación de metanol similar (Cos *et al.*, 2006), aunque aún está lejos del  $\mu_{\max}$  característico de las cepas  $Mut^s$  ( $0.035\text{ h}^{-1}$ ) (Brierley *et al.*, 1990). Los resultados experimentales aquí descritos muestran que una disminución de la temperatura de  $28^\circ\text{C}$  a  $24^\circ\text{C}$  en la etapa de inducción condujo a un aumento de la actividad metabólica de las células de levadura, como lo demuestra el aumento de la demanda de oxígeno y el consumo de metanol, lo que aumentó la velocidad específica de crecimiento.

Los  $Y_{x/s}$  fueron diferentes en los tres cultivos. Después de la oxidación del metanol por la enzima alcohol oxidasa, una fracción del formaldehído producido puede incorporarse a la biomasa en la vía de asimilación o usarse en la vía de desasimilación para la generación de energía (Vanz *et al.*, 2012). Dado que los valores de  $Y_{x/s}$  fueron más altos en los cultivos de MNLFB que en el cultivo de MLFB, la relación de las vías de asimilación/desasimilación fue mayor en el cultivo de MNLFB en comparación con el cultivo de MLFB a  $28^\circ\text{C}$ , e incluso mayor en el cultivo de MNLFB a  $24^\circ\text{C}$  que a  $28^\circ\text{C}$ . Por otro lado, un  $Y_{p/x}$  constante indica que el producto recombinante estuvo asociado al



crecimiento celular y, por tanto, una mayor proporción de las rutas de asimilación/desasimilación provocaría un aumento en la producción volumétrica. El producto recombinante (precursor de insulina glargina) se midió en el medio de cultivo y, por lo tanto, la producción del producto recombinante pasó por tres procesos moleculares: transcripción, traducción y modificaciones postraduccionales, junto con secreción. En trabajos anteriores, se observó que la transcripción se ve poco afectada por las condiciones de cultivo y que los procesos de traducción y secreción aumentan al disminuir la temperatura en la etapa de inducción con metanol (Castillo, 2014). En el presente trabajo,  $Y_{p/x}$  disminuyó cuando se compararon cultivos de MLFB con MNLFB, pero  $Y_{p/x}$  aumentó al disminuir la temperatura en la etapa de inducción. Otros trabajos indican que la secreción aumenta con la disminución de la temperatura en la etapa de inducción de metanol al disminuir el estrés del plegamiento de la proteína (Dragosits *et al.*, 2009). Si el producto recombinante no se pliega, se activa la respuesta de la proteína no plegada (UPR) aumentando la producción de proteínas chaperonas para facilitar el plegamiento. La fracción que no se pliega correctamente se degrada a través del mecanismo de degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD) (Zahrl *et al.*, 2018). En nuestro caso,  $Y_{p/x}$  fue mayor en el cultivo MLFB en comparación con el cultivo MNLFB probablemente porque la velocidad específica de crecimiento fue más baja en el cultivo MLFB, lo que afectó la velocidad de producción específica ( $q_p$ ), que también fue más baja en el cultivo MLFB. Estas bajas velocidades ( $\mu$  y  $q_p$ ) en el cultivo MLFB podrían permitir más tiempo para que el producto recombinante se pliegue, favoreciendo así la secreción en el cultivo MLFB. Esto haría que  $Y_{p/x}$  fuera más alto en los cultivos de MLFB en lugar de en los cultivos de MNLFB. Por otro lado, el  $Y_{p/x}$  del cultivo MNLFB a 24°C fue mayor que el  $Y_{p/x}$  del cultivo MNLFB a 28°C, lo que indica que la disminución de la temperatura favoreció el plegamiento intracelular (Dragosits *et al.*, 2009) y/o el proceso de traducción.

Respecto a la velocidad de consumo de sustrato específica ( $q_s$ ) se ha relacionado con la productividad específica de *P. pastoris* ( $q_p$ ) y se recomienda para el control del proceso en las cepas de Mut<sup>s</sup> (Dietzsch *et al.*, 2011). En este estudio se obtuvieron resultados similares a los descritos previamente, donde  $q_p$  aumentó a medida que aumentaba  $q_s$ , aunque el valor de  $q_s$  más alto en nuestros experimentos (0.053 g/gh o 1.7 mmol/gh) fue menor que el  $q_s$  máximo (2.0 mmol/gh) descrito para el  $q_p$  máximo

(Dietzsch *et al.*, 2011). Excepto para  $Y_{p/x}$ , el cultivo de MNLFB a 24°C mostró los valores más altos para los parámetros de crecimiento y producción celular.  $Y_{p/s}$  es inversamente proporcional al costo derivado del metanol para producir el producto recombinante. Por lo tanto, entre los tres cultivos, el cultivo de MNLFB a 24°C tiene el costo más bajo para producir el precursor de glargina.

El cultivo de MNLFB a 24°C tuvo la mayor producción volumétrica, alcanzando 2.5 veces y 1.7 veces más que los cultivos de MLFB y MNLFB a 28°C, respectivamente. Después de 75 h de inducción, se produjeron 0.196 g/L del precursor de glargina en el medio de cultivo libre de células (0.122 g/L de medio de cultivo). Este nivel de producción volumétrica fue 3.2 veces y 2 veces mayor que el obtenido de MLFB y MNLFB a 28°C, respectivamente, y 6.2 veces mayor que el nivel más alto obtenido del cultivo en matraz agitado. El límite de la etapa de lote alimentado con metanol en *P. pastoris* ocurre cuando el cultivo alcanza una concentración de DCW de alrededor de 130 gDCW/L (Hwang *et al.*, 2016). A concentraciones más altas de DCW, la velocidad de transferencia de oxígeno es baja, incluso suministrando oxígeno puro. En nuestro grupo de trabajo se ha observado este problema incluso en reactores de 120 L con una cepa KM71 Mut<sup>s</sup>, donde no fue posible mejorar la velocidad de transferencia de oxígeno suministrando oxígeno puro y usando presión cuando la concentración de DCW alcanzó valores cercanos a 130 gDCW/L. Con la información sobre el volumen de cultivo y los perfiles de biomasa durante el tiempo de inducción, es posible predecir que en el cultivo MNLFB a 24°C se alcanzaría la concentración de DCW de 130 gDCW/L a las 90 h de inducción y la producción volumétrica del precursor de glargina sería de 296.8 mg/L de medio de cultivo libre de células (159.5 mg/L de medio de cultivo). Este nivel de producción volumétrica es similar a la mayoría de los reportados para la producción de precursores de insulina humana a partir de cepas de *P. pastoris* Mut<sup>s</sup> (País *et al.*, 2003; Mansur *et al.*, 2005), aunque todavía está lejos del nivel de producción volumétrica cuando se utilizaron cepas Mut<sup>+</sup> (Gurramkonda *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018). No obstante, un estudio reciente sobre la utilidad de las cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>s</sup> para producir un precursor de insulina monomérico mostró el nivel de secreción más alto cuando se utilizaron las cepas de *P. pastoris* KM71H Mut<sup>s</sup> (Thongyoo *et al.*, 2019). La producción volumétrica más alta reportada para la producción de precursor de insulina a partir de cepas de *P. pastoris* Mut<sup>s</sup>

es de 2.26 g/L de medio de cultivo libre de células (Polez *et al.*, 2016), aprox. 1.64 g/L de medio de cultivo. Esta producción volumétrica está en el mismo orden que la descrita para la producción de precursores de insulina a partir de cepas Mut<sup>+</sup> (Gurramkonda *et al.*, 2010). En ambos trabajos (Gurramkonda *et al.*, 2010; Polez *et al.*, 2016), al sitio de ruptura de Kex2 al final de la región “pro” se le añadió un péptido espaciador que podría favorecer un procesamiento por Kex2 más eficiente y por tanto también la secreción de la proteína heteróloga.

Se han desarrollado diferentes metodologías para la obtención de precursores de insulina de alta pureza como: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad de iones metálicos, ultrafiltración y RP-HPLC (Polez *et al.*, 2016; Thongyoo *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2008; Gurramkonda *et al.*, 2010). La cromatografía de intercambio iónico es la técnica más utilizada para la purificación de proteínas a gran escala. Debido al punto isoeléctrico de las insulinas, la cromatografía de intercambio catiónico que utiliza una fase móvil a pH ácido se ha utilizado principalmente para purificar estas proteínas a partir del sobrenadante del cultivo celular (Polez *et al.*, 2016, Thongyoo *et al.*, 2019; Gurramkonda *et al.*, 2010). Normalmente, la molécula adherida a la columna se recoge después de un procedimiento de elución en gradiente ascendente de la concentración de NaCl en la fase móvil, lo que hace necesario un paso adicional para eliminar las sales (Thongyoo *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2008). En este trabajo, se exploró una estrategia de cromatografía de intercambio catiónico que implicó tanto un aumento en la concentración de NaCl como el pH de la fase móvil como un paso de lavado de la columna cromatográfica, seguido de un aumento del pH para eluir el precursor de insulina glargina. La fracción recolectada mostró un pico predominante en el análisis en RP-HPLC (Figura 44C) y dicha fracción se observó como una sola banda en un gel de poliacrilamida-SDS (Figura 42, línea 3), lo que indicó que luego del proceso de purificación se obtuvo un producto homogéneo con alta pureza (> 98%). Sin embargo, la recuperación fue del 20% debido a la baja capacidad de unión de la molécula a la resina cromatográfica. Experimentos posteriores demostraron que, la recuperación puede ser incrementada en más de dos veces cuando la solución tampón de equilibrio y en la muestra se les añade Tween-20 a una concentración final de 0.5% (v/v), sin detrimento de la pureza de la proteína recombinante. Esto se describió previamente para la unión y elución de un

precursor de insulina utilizando tecnología de adsorción de lecho expandido (Gurramkonda *et al.*, 2010).

En los últimos años, *P. pastoris* se ha convertido en un huésped de referencia para la producción de muchas proteínas recombinantes. Sin embargo, la influencia de las condiciones de cultivo sobre el nivel de expresión del gen heterólogo está relacionada con la cepa específica construida. Por lo tanto, se necesita una mayor comprensión de la relación entre los datos fisiológicos y los resultados de la producción de proteínas. Hasta donde sabemos, ningún informe describe cultivos de biorreactores que produzcan glargina o precursor de glargina utilizando *P. pastoris* como huésped, ni explica por qué la proteasa Kex2 a veces no procesa adecuadamente el polipéptido a pesar de que tiene una secuencia de reconocimiento correcta. En este trabajo se aporta conocimiento sobre la producción de precursores de insulina glargina utilizando cepas Mut<sup>s</sup>. La estrategia MNLFb a 24°C fue la mejor de las ensayadas, porque mostró los valores de  $Q_p$ ,  $Y_{p/s}$  y  $q_p$  más altos.

La insulina glargina de cadena doble podría obtenerse mediante ruptura enzimática del precursor de glargina de cadena simple obtenido del medio de cultivo libre de células, preferiblemente citraconilando los residuos de lisina de la proteína precursor de glargina para que no sean reconocidos por tripsina, seguido del corte con tripsina del lado C-terminal de la secuencia Arg-Arg que une a la cadena-B y la cadena-A de la molécula (Hwang *et al.*, 2016), o directamente co-produciendo y secretando la proteasa Kex2 truncada y soluble al medio de cultivo, como se describió previamente (Sreenivas *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2000).

Los resultados del presente trabajo indicaron que el estudio del mercado de insulinas en México permitió identificar la insulina glargina como proteína modelo para la producción en *P. pastoris*. Se construyó una cepa recombinante *P. pastoris* KM71ILGXN Mut<sup>s</sup> que secretó el precursor de glargina. El proceso productivo desarrollado permitió obtener un producto homogéneo con pureza superior al 98%, que es económicamente rentable y técnicamente escalable a nivel industrial, que se puede satisfacer el 34% de la demanda anual del IMSS y que el costo de producción del precursor de insulina glargina fue de 12.2 USD/g de insulina, 70 veces menor que el valor del precio en el mercado nacional.

## 9 CONCLUSIONES

Se cumplieron los tres objetivos planteados en el trabajo, llegando a las siguientes conclusiones:

1. Se estimó el tamaño del mercado de las insulinas en México y un segmento específico, lo cual permitió la selección del producto objeto del estudio: Insulina glargina (es un análogo de la insulina humana, de liberación prolongada y que representó el costo más alto al IMSS por unidad de compra).
2. Se definieron las características de un proceso escalable y económicamente rentable para la producción de la insulina glargina, en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*, sin embargo, es recomendable un análisis más específico considerando un programa productivo a nivel industrial más detallado que permitan aproximaciones de costos de inversión y de operación más certeras.
3. Se diseñó y construyó una cepa recombinante *Pichia pastoris* KM71ILGXN Mut<sup>s</sup> que secreta al medio de cultivo el precursor de insulina glargina.
4. El análisis de los modelos molecular de las formas dimérica y hexamérica de la glargina monocatenaria mostró que el sitio potencial de ruptura por la endo-proteasa Kex2 en la molécula de insulina glargina monocatenaria se encuentra oculto en el interior del complejo dimérico y hexamérico, lo cual impide el procesamiento intracelular del precursor de glargina y pudo ser el factor determinante para la no obtención de la insulina glargina de doble cadena.
5. Se desarrolló un bioproceso para la producción del precursor de insulina glargina a nivel de laboratorio y factible ser escalado. La mayor producción volumétrica alcanzada fue de 121.8 mg/L.
6. Con un paso cromatográfico de intercambio catiónico se obtuvo el producto precursor de insulina glargina recombinante purificado homogéneo y con pureza mayor al 98%.
7. A escala industrial el proceso productivo desarrollado puede satisfacer el 34% de la demanda anual de insulina glargina para el IMSS.
8. Se estimó que el costo de producción fue de 12.2 USD/g de glargina, valor que es 70 veces menor que el precio de este producto en el mercado nacional.

Finalmente se concluye que: se desarrolló un bioproceso basado en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*, técnicamente escalable a nivel industrial, con una factible rentabilidad económica. Por tanto, se tiene un prototipo de un proceso, a nivel de laboratorio, para la producción de la insulina glargina.

## 10 PERSPECTIVAS

A partir de los resultados del presente trabajo surgieron nuevas hipótesis que podrían contribuir al progreso en este campo de estudio:

1. Optimizar el bioproceso para incrementar los niveles de producción del precursor de insulina glargina. En este sentido, la evaluación de condiciones de temperatura por debajo de 24°C y/o incrementar la densidad celular antes de comenzar la etapa de inducción son factible de ensayar. En este caso es necesario realizar un paso de conversión del precursor de insulina glargina para obtener la insulina glargina de dos cadenas.
2. Realizar nuevas construcciones para la molécula glargina y evaluar la posibilidad de obtener un producto secretado como molécula insulina glargina de dos cadenas. En este sentido, se podría incluir un péptido espaciador entre la Cadena-A y Cadena-B el cual permita la ruptura de la molécula monocatenaria por la endo-proteasa Kex2. Otra posibilidad es co-produciendo y secretando la proteasa Kex2 troncada y soluble al medio de cultivo.

## 11 APÉNDICES

### 11.1 Preparación de medios, soluciones y reactivos

#### Preparación de soluciones y soluciones amortiguadoras

- SDS 10%: Disolver 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua destilada, durante la preparación calentar a 68°C para facilitar la disolución.
- TE 1X (Tris-EDTA: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0): Mezclar 2 mL de EDTA 500 mM pH 8.0 con 10 mL de Tris-HCl pH 8.0). Aforar a 1L con agua destilada. Esterilizar por autoclave y almacenar a TA.
- EDTA 500 mM, pH 8.0: Disolver 186.1 g de EDTA en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 N (o lentejas de NaOH). Aforar a 1000 mL. Esterilizar por autoclave, almacenar a temperatura ambiente. Nota: El EDTA se disolverá cuando la solución alcance pH 8.0.
- NaOH 10 N: Disolver 10 g de NaOH anhidro en 25 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave. Almacenar a TA.
- Agarosa 0.8%: Mezclar 0.8 g de agarosa con 100 mL de TBE 1X. Calentar con ayuda del microondas hasta que se disuelva completamente (aproximadamente 1 min). Vaciar la solución en el molde del gel. Dejar solidificar por varios minutos a TA.
- TBE 10X (Tris-boratos-EDTA). Para preparar la solución Stock 10X: Disolver 108 g de Trizma base, 55 g de ácido bórico y 9.3 g de EDTA en 600 mL de agua destilada, aforar a 1000 mL con agua destilada y esterilizar en autoclave. Almacenar a TA.
- TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM): Mezclar 100 mL de TBE 10X y agregar 900 mL de agua destilada (Volumen final de 1 L). Almacenar a TA.
- SEVAG (Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1): Mezclar 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico.
- Solución amortiguadora de lisis (TSNT) (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.8, EDTA 1 mM): Disolver 500 µL de Triton X-100 en 15 mL de agua destilada, posteriormente disolver 146.25 mg de NaCl, agregar 2.5 mL de SDS al 10%, agregar 500 µL de Tris-Cl 500 mM pH 8 y 50 µL de EDTA 500 mM. Aforar a 25 mL. Esterilizar en autoclave. Almacenar a TA.



- Tris-HCl 500 mM pH 8.0: Disolver 6.05 g de Tris en 50 mL de agua destilada. Ajustar a pH 8.0 con HCl. Aforar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave. Almacenar a 4°C.
- NaCl 100 mM: Añadir 5 mL de NaCl 1 M en un matraz de aforación y aforar a 50 mL. Almacenar a TA.
- Gel Red Nucleic Acid 100 X: Disolver 20 µL de Gel Red Nucleic Acid 10000X (Solución stock) en un volumen final de 2 mL de NaCl 100 mM.

#### **Preparación de soluciones para la transformación de células de *Escherichia coli***

- Medio isotónico SOC (Tryptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 10 mM,  $Mg^{2+}$  20 mM, Glucosa 20 mM): Disolver 2 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 mL de NaCl 1 M y 1 mL de KCl 1 M en 97 mL de agua destilada. Agitar hasta disolver. Esterilizar por autoclave y enfriar a TA. Añadir 1 mL de solución stock de  $Mg^{2+}$  2 M y 1 mL de glucosa 2 M (para una alcanzar una concentración final de 20 mM). Aforar a 100 mL con agua destilada estéril. Almacenar a 4°C.
- NaCl 1 M (Para solución medio SOC y tinción de ácidos nucleicos): Disolver 5.84 g de NaCl en 50 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave y enfriar a TA. Almacenar a 4°C.
- KCl 1 M (Para solución medio SOC): Disolver 3.72 g de KCl en 50 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave y dejar enfriar a TA. Almacenar a 4°C.
- Glucosa 2 M (Para solución medio SOC): Disolver 36.04 g de D-glucosa en 50 mL de agua destilada estéril. Aforar a 100 mL con agua destilada estéril. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.
- $Mg^{2+}$  2 M (Para solución medio SOC): Disolver 9.52 g de  $MgCl_2$  y 24.65 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  en 100 mL de agua destilada estéril. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.
- $CaCl_2$  1 M: Disolver 11.1 g de  $CaCl_2$  en 80 mL de agua destilada. Aforar a 100 mL. Esterilizar por autoclave, dejar enfriar y almacenar a TA.
- IPTG (10 mM): Disolver 238 mg de IPTG en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.
- Medio LB (Luria-Bertani: Bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%): Disolver 10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 1000 mL

de agua destilada. Ajustar a pH 7.5 con NaOH 10 N. Nota: Cuando se requiera agar, adicionar a la mezcla anterior 15 g de agar bacteriológico. Esterilizar por autoclave y dejar enfriar a TA, agregar la ampicilina (100 µg/mL), homogenizar y hacer alícuotas de 4 mL en viales de 15 mL, o en cajas de Petri. Almacenar a 4°C o TA.

- Ampicilina (25 µg/µL): Disolver 250 mg de ampicilina en 10 mL de agua destilada estéril. Esterilizar por filtración. Almacenar a -20°C.

#### **Preparación de soluciones para obtener las células de *Pichia pastoris* electro-competentes**

- Sorbitol 1 M: Disolver 9.1 g de sorbitol en 50 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave y dejar enfriar a TA. Almacenar a 4°C.
- HEPES 1 M: Solución tampón de ácido sulfónico de ion híbrido (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico): Disolver 2.61 g de DTT en 10 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.
- DTT 1 M: Disolver 1.54 g de DTT en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

#### **Preparación de soluciones para la transformación de células de *Pichia pastoris***

- Extracto de levadura peptona dextrosa (YPD/YPD- agar): Extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 1%): Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa en 1 L de agua destilada. Esterilizar por autoclave y dejar enfriar a TA. Almacenar a TA. Nota: Cuando se requiera YPD agar, añadir a la mezcla anterior 20 g de agar bacteriológico, mezclar y esterilizar por autoclave, dejar enfriar a TA y verter cuidadosamente en cajas Petri. Almacenar a 4°C.
- 10 XD (Glucosa 20%): Disolver 20 g de glucosa en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.
- Medio RDB y RDBH (Sorbitol 1 M, agar bacteriológico 2%, glucosa 2%, YNB 1.34%, biotina 4x10<sup>-5</sup>%, aminoácidos 0.005%, +/- Histidina 0.004%): Disolver 93 g de sorbitol y 10 g de agar bacteriológico en 350 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave, dejar enfriar a TA y mantener a 60°C. Esterilizar en autoclave 44 mL de agua destilada, dejar enfriar a TA y agregar 50 mL de dextrosa 20%, 50 mL YNB 10X, 1 mL de biotina 500X, 5 mL de aminoácidos 100X y precalentar a 45°C. Agregar 5 mL de Histidina 100X a la mezcla precalentada, para el crecimiento de cepas his<sup>+</sup> (prueba

de viabilidad). Adicionar la mezcla precalentada a 45°C, al sorbitol y agar previamente mantenidos a 60°C (345 mL de agua estéril más sorbitol y agar). Homogenizar, vaciar en cajas Petri, y sellar una vez que solidifica el medio. Almacenar a 4°C o TA.

- Histidina 100X (Histidina 0.4%): Disolver 400 mg de L-histidina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

#### **Preparación de soluciones para la reactivación e inducción de *Pichia pastoris***

- Solución amortiguadora de fosfatos 1 M, pH 6.0: Disolver 1.03 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 12.8 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 80 mL de agua destilada, ajustar a pH 6.0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o con KOH. Aforar a 100 mL, esterilizar por autoclave, dejar enfriar a TA. Almacenar a TA.
- 500X B (Biotina 0.02%): Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.
- Glicerol 10%: Mezclar 100 mL de glicerol absoluto y aforar a 1000 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave y dejar enfriar a TA. Almacenar a 4°C.
- 10X YNB (Base de levadura nitrogenada con sulfato de amonio y sin aminoácidos al 13.4%): Disolver 134 g de YNB en 1000 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.
- Aminoácidos (aa 100X, 0.5% para cada Aminoácido): Disolver 500 mg de los siguientes aminoácidos: ácido L-glutámico, L-Metionina, L-Lisina, L-Leucina e Isoleucina en 100 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.
- Medio mínimo amortiguado con glicerol o BMG (Solución tampón fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4x10<sup>-5</sup>%, glicerol 1%): Para 100 mL de BMG, mezclar 10 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 1 M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de biotina 500X, 10 mL de glicerol 10% y 70 mL de agua destilada estéril. Añadir en un matraz de 1 L y hacer prueba de esterilidad (incubación a 30°C y 72 h). Almacenar a TA.
- Medio mínimo amortiguado con metanol o BMM (Solución amortiguadora de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4x10<sup>-5</sup>%): Para 100 mL de BMM, mezclar 10 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 1 M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de B500X y 80 mL de agua destilada estéril. Distribuir 20 mL en matraces de 250 mL y hacer prueba de esterilidad (incubación a 30°C y 72 h). Almacenar a TA.

### **Soluciones para los pasos cromatográficos de filtración en gel e intercambio catiónico**

- Solución amortiguadora de acetato de sodio: Preparar las siguientes soluciones “stock”, A) 0.2 M de ácido acético (11.5 mL en 1 L) y B) solución de acetato de sodio (16.4 g de  $C_2H_3O_2Na$  o 27.2 g de  $C_2H_3Na \cdot 3H_2O$  en 1 L).

Para la solución acetato de sodio 100 mM pH 3.6: Mezclar 46.3 mL de solución A con 3.7 mL de solución B y enraizar a 100 mL. Para suplementar la solución con 250 mM de cloruro de sodio, añadir 1.45 g de NaCl.

Para la solución acetato de sodio 100 mM pH 5.6: Mezclar 4.8 mL de solución A con 45.2 mL de solución B y enraizar a 100 mL.

### **Soluciones para realizar la determinación de proteínas totales (Método de Bradford)**

- Azul brillante de Coomassie: Disolver 100 mg del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95%. Agitar vigorosamente. Agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85%. Mezclar vigorosamente por 20-30 min. Enraizar a 1 L con agua destilada, agitar por 20-30 min. Filtrar con papel de filtro cualitativo de grado 1 (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA), para eliminar restos del colorante no disuelto. Almacenar en un frasco de vidrio ámbar a 4°C.
- Solución de albúmina sérica bovina (ASB 1 mg/mL): Pesar 5 mg de ASB en un matraz de aforo de 5 mL y aforar con agua destilada.
- Solución de albúmina sérica bovina (ABS 50 µg/mL): Colocar 250 µL de ASB a 1 µg/µL en un matraz de aforo de 5 mL y aforar con agua destilada.

### **Soluciones para realizar la SDS-PAGE**

- Solución de corrida 5X (Tris-HCl 0.125 M, glicina 0.96 M, SDS 0.5%, pH 8.3): Pesar 3.8 g de Trizma base, 18.0 g de glicina, 1.3 g de SDS y disolver cuidadosamente en 150 mL de agua destilada. Aforar a 250 mL con agua destilada. Almacenar a TA. Nota: Diluir a 1X con agua destilada justo antes de usarse.
- Solución fijadora (metanol 50%, ácido acético 10%): Mezclar 250 mL de metanol con 50 mL de ácido acético, aforar a 500 mL con agua destilada. Almacenar a TA.
- Solución de tinción (Azul brillante de Coomassie R250 0.20%, metanol 50%, ácido acético 10%): Disolver 0.2 g de azul brillante de Coomassie R250 en 30 mL de agua destilada, agregar 50 mL de metanol y 10 mL de ácido acético. Aforar a 100 mL con agua destilada, agitar por 20-30 min. Filtrar con papel de filtro cualitativo de grado 1

(Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA), para eliminar restos del colorante no disuelto. Almacenar el reactivo en un frasco de vidrio ámbar a TA.

- Solución decolorante (metanol 5%, ácido acético 7%): Mezclar 50 mL de metanol con 70 mL de ácido acético, aforar a 1000 mL con agua destilada. Almacenar a TA.
- Tris-HCl 2 M pH 8.0: Disolver 12.1 g de Trizma base en 30 mL de agua destilada. Ajustar a pH 8.0 con HCl al 37%. Aforar a 50 mL con agua destilada. Filtrar (0.45 µm). Almacenar a 4°C.
- Tris-HCl 2 M pH 8.0: Disolver 12.1 g de Trizma base en 30 mL de agua destilada. Ajustar a pH 6.9 con HCl al 37%. Aforar a 50 mL con agua destilada. Filtrar (0.45 µm). Almacenar a 4°C.
- Acrilamida/bisacrilamida: Se empleó una solución suministrada por la casa comercial Bio-rad (Bio-Rad Laboratories SA, CA, EE.UU) que contiene los siguientes componentes: Acrilamida 28.5%, N,N'-metilen-bis-acrilamida y 1.5% (Relación 19:1). Esta solución se empleó directamente del reactivo. Almacenada a 4°C.
- Persulfato de amonio al 10% (PSA): Disolver 100 mg de persulfato de amonio en 1 mL de agua estilada. Almacenar a -20°C.
- TEMED: La tetrametiletilendiamina, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina. Esta solución se empleó directamente del reactivo. Almacenada a 4°C.

#### **Preparación de soluciones para la fermentación**

- PTM1 Solución de sales trazas (CuSO<sub>4</sub> 24 mM, NaI 0.53 mM, MnSO<sub>4</sub> 19.87 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.83 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.32 mM, CoCl<sub>2</sub> 2.10 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0.15 mM, FeSO<sub>4</sub> 0.23 mM).
- Solución tampón con sales basales (FBS) y glicerol: por litro: 26.7 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85%, 0.93 g de CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 18.2 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14.9 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4.13g KOH y 50 g de glicerol.
- Medio salino para las fermentaciones: Para 1800 mL poner a disolver en 1 L de agua CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.86 g, KOH 8.32 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 29.80 g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 36.40 g. Añadir H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 53.4 mL, se observa que la solución de vuelve transparente. Añadir 100 g de glicerol (Nota: se hace por pesada). Enrazar a 1800 mL (para el caso de la fermentación para obtener el inóculo) o a 2000 mL para las fermentaciones en cultivos con inducción.

## 170



CAP protein binding site: 615-578 (compl. strand);  
mRNA (LacZ): starts at nt position 531 (compl. strand);  
DNA replication: initiates at position 890;  
lac repressor binding site: 531-511 (compl. strand);  
bla gene: 2510-2442 (compl. strand).

AarI, AaeI, AcaI, AccII, AceII, AdeI, Afa24RI, AfeI, AfIII, AgeI, AhyAI,  
AieI, AioI, AioII, AoiII, ApeI, Apu6I, AscI, As18I, AteI, AtuCI, AvrII,  
BaeI, BaeII, BalI, Bbs74III, BbsI, BbvCI, BceII, BclI, Bco102II, Bco63I,  
BcuI, BglII, BlpI, Bme7I, BmgII, BmtI, BoxI, BpII, BpII\*, Bpu1I, Bpu10I,  
Bpu1268I, BsaAI, BsaBI, BsaPI, BsaKI, BscEI, BscJ, Bse59I, BseAI, BseI,  
BsiAI, BsmFI, BsmGI, BsoDI, Bsp19I, Bsp87I, BspCI, BspEI, BspGI,  
BspL1111II, BspMI, BsrBRI, BsrGI, BssHII, Bst1107I, Bst224I, Bst29I,  
Bst98I, BstNI, BstEII, BstHPI, BstXI, BstZ17I, Bsu36I, BsuMI, BtgI, BtrI,  
CaiNI, CfrAI, ClaI, CspI, Csp45I, DraIII, DrrII, DseI, BsgI, EcaI, EciAI,  
Eco47III, Eco52I, Eco72I, EcoAI, EcoBI, EcoDI, EcoXXI, EcoDR3, EcoEI,  
EcoNI, EcoR124I, EcoR1747I, EcoB3I, FaeI, FaeII, FlnI, FocI, FopAI, FsuI,  
HpaI, M.Hae879I, MfeI, MluI106I, MluI13I, MluI, MscI, Msp20I, MunI, NaeI,  
NcoI, NciI, NgeMIV, NheI, NotI, PacI, PaeI, PflMI, PfuI, PnaAI, PmeI,  
PmlI, PpsI, PpuMI, PshAI, PstI, PstII, PstI\*, RleAI, RsrII, SaeII, SmaDI,  
SmaLEI, SbfI, SclI, SdaI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SmaAI, SnaI, SnaBI,  
SpeI, SrfI, Sse232I, Sse8307I, Sse8647I, StyI, StySKI, StySQ, SwaI,  
TagII\*, TthIII, Uba122II, Vap9II, XbaI, XhoI, XmaII.

AccI 434, AclII 2645, Acc65I 408, AccEBI 435, AccI 449, AclI 438, AccI  
 396, AccI37II 447, AflIV 2200, AclIII 830, AbdI 1723, Aini 452, AluNI  
 1246, AmlI 413, ApaBI 196, ApsI 446, ApoI 396, ApsII 439, Asp52I 470,  
 AspSHI 464, Asp78I 458, AvaIII 419, AvaI 439, BamHI 435, BbsAI 234, BneI  
 239, BbrI 471, BglI 2226, BglI 2262, Bco35I 1807, BfrBI 422, Bli49I 1789,  
 BnaI 435, BpsI 1793, BsaI 1784, BsaMI 424, BsaXI\* 705, BsaXI 675, BbsI  
 117, BaeYI 1134, BshII 428, BsmBI 45, BsmI 424, BspJ106I 407, BspLUII  
 830, BsaFI 1803, BstAPI 185, Cfr10I 1803, Cfr9I 439, CfrJ4I 441, ChuII  
 447, DaaYI 447, EcoEI 441, Eco137I 401, EcoNMI 1723, EcoVIII 471, Eco3II  
 1784, Eco82I 395, Eco88I 439, EcoB2 397, EcoICRI 404, EcoKI 2380,  
 EcoO10I 2699, EcoRI 396, EcoRV 431, EcoRPI 478, EhoI 237, Esp3I 45, FblI  
 449, HaeI 396, HincII 450, HincII 450, HindIII 471, KaeI 235, KpnI 412,  
 NarI 236, NdeI 184, N11387/7I 443, NruI 416, NsiI 424, PciI 830, PflI108I  
 1738, PpeI 446, Ppu10I 420, Ppu1253I 2640, PspAI 439, PspOMI 442, PssI  
 2702, PstI 457, Rhl4273I 447, SacI 406, SalI 448, SapI 714, ScaI 2203,  
 SfoI 237, SmaI 441, SphI 469, SsoI 396, SspI 2527, SstI 406, StuI 461,  
 Sty6J 158, Sty8PI 2380, SymII 2317, TthIII1I 1427, Uba220I 438, Uba1326I  
 2697, Uba1382I 417, XbaI 425, XmaI 439, XmaI 2322, XraI 2643.

171



**Bio Basic Inc.**

**A world leader in serving**

## **Instructions**

Dear Valued Customer,

Thank you for choosing Bio Basic Inc. for your gene synthesis services. Here are some electronic files regarding your target gene including our QC report. Should you have any questions or concerns, please do not hesitate to contact us. We would be more than happy to assist you to the best of our ability with your research.

Yours faithfully,

Gene Synthesis Department  
Bio Basic Inc.  
20 Konrad Crescent,  
Markham Ontario L3R 8T4 Canada  
Tel: (905) 474 4493  
E-mail: [gene@biobasic.com](mailto:gene@biobasic.com)

### **Instructions for files in the pack:**

1. ".pdf". Portable Document Format (PDF) is an open standard for documents exchange. Any pdf viewer software can be used to view this file, or download Adobe® Reader® at: <http://www.adobe.com/products/reader.html>
2. ".ab1". Sequence trace files are the output files from Applied Biosystem's Sequencing Analysis software. Any chromatograms viewer or download "Chromas Lite" at: [http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)
3. ".fasta". Fasta format is a text-based format, a sequence in fasta format begins with a single-line description, followed by lines of sequence data. The description line is distinguished from the sequence data by a greater-than (">") symbol in the first column. The file can be viewed and edited with ease using a text editor.
4. ".seq". Sequence file created by a sequence analysis software called Lasergene®, which can be downloaded at: <http://http://www.dnastar.com/>, this file can also be viewed simply by any text editor.
5. ".sqd". Sequence alignment by Lasergene®, if you do not have this software to view alignment, a pdf file show alignment results is also provided.

---

20 Konrad Cres., Markham Ontario L3R 8T4 Canada  
Tel: (905) 474 4493, (800) 313 7224 Fax: (905) 474 5794  
Email: [order@biobasic.com](mailto:order@biobasic.com) Web: [www.biobasic.com](http://www.biobasic.com)





**Bio Basic Inc.**

**A world leader in serving**

**Instructions for plasmid reconstitution:**

1. Before opening the tube containing the DNA, please briefly centrifuge the tube. Lyophilized DNA could attach to the wall of the tube. Opening without centrifugation may cause DNA loss.
2. The lyophilized plasmid is stable at -20°C for at least 1 year. Plasmid dissolved in TE is stable for at least 6 months at -20°C or 4°C. Plasmid dissolved in water is stable for at least 6 months at -20°C in the absence of nucleases. Be sure the water used is at neutral pH to avoid depurination.

**Recommended protocols for re-plating:**

1. Re-suspend lyophilized DNA (4 µg) in 40 µl of 10 mM Tris buffer (pH 8.5). Final concentration is ~100 ng/µl. This is the original stock. Please note, 4 µg is an approximate amount. To accurately determine the quantity of DNA present, please measure by optical density at OD260.
2. In a new centrifuge tube, make a 1:10 dilution of original stock in 10 mM Tris buffer (pH 8.5). This is 1:10 diluted stock.
3. To plate DNA, transform 2 µl of original stock DNA and 2 µl 1:10 diluted stock DNA into appropriate *E. coli* competent cells. Incubate mixture on LB agar plates (with desired antibiotic selection) at 37°C overnight.
4. Select a well separated, **SINGLE** colony and inoculate in LB medium with desired antibiotic selection for larger scale culture. **NOTE: It is important to select a SINGLE colony.**
5. Purify DNA from large culture. Verify sequences by sequencing and continue with project of interest.
6. If you encounter any problems, please do not hesitate to contact us. We will be more than happy to assist you.

**Instructions for bacteria growth:**

If not stated, *E. coli* cells harboring plasmids are cultured in LB medium with appropriate antibiotic at 37°C during our manipulation.

20 Konrad Cres., Markham Ontario L3R 8T4 Canada  
Tel: (905) 474 4493, (800) 313 7224 Fax: (905) 474 5794  
Email: [order@biobasic.com](mailto:order@biobasic.com) Web: [www.biobasic.com](http://www.biobasic.com)

### 11.3 Tablas de los cálculos económicos

**Tabla 26.** Indicadores para el cálculo del valore actual neto (VAN). El dinero se expresa en pesos (MXN).

año	Inversión	viales (10 mL, 3.64 mg/mL)	As	Ate	Aci	Ait	Anci	Ingreso	Atc	Acf	fd	Ingreso Neto	Adcf	VAN
0	\$329,967,000	0	0	0	0	0	0	-\$131,986,800	\$131,986,800	-\$131,986,800	1.0000	-131,986,800	-\$131,986,800	-\$131,986,800
1		0	0	0	0	0	0	-\$197,980,200	\$197,980,200	-\$197,980,200	0.9091	-197,980,200	-\$179,982,000	-\$311,968,800
2			590,326	-\$4,000,000	\$64,050,371	\$11,529,067	\$52,521,304	\$60,050,371	0	\$52,521,304	0.8264	49,628,406	\$43,406,037	-\$268,562,763
3			1,180,652	-\$8,000,000	\$128,100,742	\$23,058,134	\$105,042,608	\$120,100,742	0	\$105,042,608	0.7513	90,233,465	\$78,920,066	-\$189,642,697
4			1,216,072	-\$7,600,000	\$131,943,764	\$23,749,878	\$108,193,887	\$124,343,764	0	\$108,193,887	0.6830	84,928,464	\$73,897,880	-\$115,744,817
5			1,276,875	-\$7,980,000	\$138,540,952	\$24,937,371	\$113,603,581	\$130,560,952	0	\$113,603,581	0.6209	81,068,079	\$70,538,886	-\$45,205,931
6			1,340,719	-\$8,379,000	\$145,468,000	\$26,184,240	\$119,283,760	\$137,089,000	0	\$119,283,760	0.5645	77,383,167	\$67,332,573	\$22,126,642
7			1,407,755	-\$8,797,950	\$152,741,400	\$27,493,452	\$125,247,948	\$143,943,450	0	\$125,247,948	0.5132	73,865,750	\$64,272,001	\$86,398,643

As: Ventas anuales (número de viales). Ate: Costo de la producción. Aci: Venta de efectivo anual. Ait: impuestos. Anc: Venta de efectivo anual teniendo en cuenta los impuestos. Atc: Costo de inversión. Acf: Flujo efectivo. fd: Descuento del dinero en el tiempo.

Valores de As: Se estimó la producción de 10 lotes de fermentación en el primer año del proceso productivo. A partir del segundo año de producción se estimó una realizar 20 lotes de fermentación anual y con un incremento del 5% cada año.

Valores de Ate: Se estimaron los costos directos e indirectos (Tablas 25 y 26) a nivel de fermentación. Para el primer año de producción se estimó realizar el proceso productivo durante 6 meses, con esquema de trabajo de semanas alternas para la fermentación y los procesos de purificación y conformación del ingrediente farmacéutico activo.

Valores de Aci: Se estimó un valor de 108.5 pesos el vial, según compras realizadas por el IMSS en el 2016.

Valores de Ait: Se estimó un impuesto del 18%.

Valores de Atc: Se estimó el 40 y 60% del valor total de la inversión para el primer y segundo año, respectivamente.

Valores de fd: Se calculó según la expresión  $fd=1/(1+TREMA\ 10\%)^{0.1}$ . El valor de 0.1 corresponde a una tasa fija de descuento del 10%.

**Tabla 27.** Cálculo de los costos directos de operación

Concepto	Monto			Estructura costo directos (%)
	MXN/mes	USD/fermentación	USD/año	
Materia prima y material de empaque	\$105,304.00	\$5,850.22	\$117,004.44	50.1
Renta de equipo de producción	-	-	-	
Mano de obra directa	\$69,701.27	\$3,872.29	\$46,467.51	19.9
Supervisión	\$13,940.25	\$774.46	\$9,293.50	4.0
Servicios auxiliares	\$7,816.20	\$434.23	\$5,210.80	2.2
Mantenimiento y reparación	\$75,750.00	\$4,208.33	\$50,500.00	21.6
Suministro de operación	\$7,575.00	\$420.83	\$5,050.00	2.2
<b>TOTAL</b>	<b>\$4,203,472.54</b>	<b>\$15,560.37</b>	<b>\$233,526.25</b>	

El valor de cambio se estimó 18 peso/USD, según datos de 2016.

El valor del concepto de “Materia prima y material de empaque” se obtuvo a partir de un estimado de una fermentación en 70 m<sup>3</sup> para la producción de fitasa recombinante. En este caso se dividió por 15 para estimar el valor en un fermentador de 3 m<sup>3</sup> y se tuvo en cuenta que es un producto parenteral y una producción anual de 20 lotes.

Concepto de Mano de obra directa: estimado para un grupo de trabajo de siete operarios y dos profesionistas.

Concepto de Supervisión: Estimado de un 20% del costo de la mano de obra directa.

Concepto de Servicios auxiliares: Estimado ídem al concepto de materia prima y material de empaque.

Concepto de Mantenimiento y reparación: Se estimó el 0.5% del valor de la inversión fija (Tabla 21, Subtotal ICF).

Concepto de suministro de operaciones: Se estimó el 10 de mantenimiento y reparación.

**Tabla 28.** Cálculo de los costos indirectos de operación

Concepto		Costo anual	
		MXN	USD
	equipos	\$3,000,000.00	\$166,666.67
Depreciaciones y amortizaciones	transporte	\$525,000.00	\$29,166.67
	obra civil	\$660,000.00	\$36,666.67
Material de Limpieza		\$61,125.00	\$3,395.83
Mano de obra indirecta		\$20,910.38	\$1,161.69
TOTAL		\$4,267,035.38	\$237,057.52

Concepto de depreciaciones y amortizaciones: Con respecto a los equipos se estimó un 5% del equipamiento (Tabla 21, CE), para el transporte se estimó un 20% de la inversión indirecta que a su vez es la fracción 0.175 del costo del equipamiento (Tabla 21, CE) y para la obra civil se estimó un 5% de la construcción civil (Tabla 21). La mano de obra indirecta se estimó en un tercio del valor de la mano de obra directa.

## 11.4 Resultados del análisis

### estadístico

**Tabla 29.** Valores de la Densidad Celular (DC) para los cultivos de *Pichia pastoris* KM71ILGXN con inducción a 48 h.

clonas	DC (g/L)	clonas	DC (g/L)
1	9.32	41	7.78
2	8.46	42	9.19
3	9.17	43	8.86
4	9.36	44	9.88
5	9.89	45	9.3
6	8.84	46	8.68
7	9.05	47	7.87
8	9.09	48	8.95
9	8.76	49	8.35
10	8.76	50	8.85
11	8.71	51	8.78
12	8.63	52	9.67
13	8.21	53	9.14
14	8.69	54	8.84
15	8.52	55	9.13
16	9.11	56	9.2
17	8.34	57	8.76
18	8.98	58	8.97
19	8.91	59	8.55
20	8.7	60	8.67
21	9.49	61	9.69
22	8.08	62	8.72
23	9.45	63	9.39
24	8.83	64	8.3
25	8.51	65	9.36
26	8.39	66	9.49
27	10.1	67	8.71
28	9.21	68	8.62
29	9.14	69	8.02
30	9.01	70	8.99
31	8.83	71	8.67
32	8.05	72	8.42
33	9.31	73	8.76
34	9.78	74	8.47
35	9.64	75	9.7
36	8.24	76	8.54
37	8.74	77	8.52
38	8.2	78	8.95
39	8.9	79	9.41
40	8.78	80	9.98

### Resumen Estadístico para DC.

Recuento	80
Promedio	8.90387
Desviación Estándar	0.501571
Coefficiente de Variación	5.63318%
Mínimo	7.78
Máximo	10.1
Rango	2.32
Sesgo Estandarizado	0.731665
Curtosis Estandarizada	-0.341583

### El StatAdvisor

Esta tabla muestra los estadísticos de resumen para DC. Incluye medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma. De particular interés aquí son el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, las cuales pueden utilizarse para determinar si la muestra proviene de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar. En este caso, el valor del sesgo estandarizado se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

**Tabla 30.** Valores de la Concentración de proteínas totales extracelular para los cultivos de *Pichia pastoris* KM71ILGXN con inducción a 48 h.

clonas	Con. Prot. Totales (mg)	clonas	Con. Prot. Totales (mg)
1	59.4	41	40.56
2	57.31	42	40.06
3	55.57	43	39.95
4	54.85	44	39.26
5	54.85	45	38.79
6	53.75	46	38.36
7	53.64	47	37.99
8	53.59	48	37.78
9	52.03	49	37.58
10	51.61	50	36.51
11	51.56	51	36.04
12	51.46	52	36
13	51.19	53	35.9
14	50.94	54	35.35
15	50.9	55	34.78
16	49.9	56	34.63
17	48.7	57	33.51
18	48.66	58	33.51
19	48.55	59	33.33
20	48.34	60	32.24
21	48.25	61	32.24
22	47.07	62	31.01
23	46.85	63	30.62
24	46.67	64	30.22
25	46.09	65	29.93
26	45.83	66	27.59
27	45.7	67	26.74
28	45.37	68	26.6
29	43.71	69	26.35
30	43.09	70	25.63
31	43.02	71	25.23
32	42.7	72	25.16
33	42.51	73	24.22
34	42.48	74	23.77
35	42.3	75	21.61
36	42.04	76	19.95
37	41.75	77	17.74
38	41.18	78	8.79
39	40.91	79	7.73
40	40.63	80	2.22

## Resumen Estadístico para Conc. Prot.

Recuento	80
Promedio	39.0054
Desviación Estándar	11.7212
Coefficiente de Variación	30.0502%
Mínimo	2.22
Máximo	59.4
Rango	57.18
Sesgo Estandarizado	-2.84972
Curtosis Estandarizada	1.2324

### El StatAdvisor

Esta tabla muestra los estadísticos de resumen para Conc. Prot. Incluye medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma. De particular interés aquí son el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, las cuales pueden utilizarse para determinar si la muestra proviene de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar. En este caso, el valor de sesgo estandarizado no se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

**Tabla 31.** Valores de Rendimiento (Proteína extracelular/biomasa) para los cultivos de *Pichia pastoris* KM71ILGXN con inducción a 48 h

clonas	Rendimiento (mg/g)	clonas	Rendimiento (mg/g)
1	6.4	41	5.2
2	6.8	42	4.4
3	6.1	43	4.5
4	5.9	44	4
5	5.5	45	4.2
6	6.1	46	4.4
7	5.9	47	4.8
8	5.9	48	4.2
9	5.9	49	4.5
10	5.9	50	4.1
11	5.9	51	4.1
12	6	52	3.7
13	6.2	53	3.9
14	5.9	54	4
15	6	55	3.8
16	5.5	56	3.8
17	5.8	57	3.8
18	5.4	58	3.7
19	5.5	59	3.9
20	5.6	60	3.7
21	5.1	61	3.3
22	5.8	62	3.6
23	5	63	3.3
24	5.3	64	3.6
25	5.4	65	3.2
26	5.5	66	2.9
27	4.5	67	3.1
28	4.9	68	3.1
29	4.8	69	3.3
30	4.8	70	2.9
31	4.9	71	2.9
32	5.3	72	3
33	4.6	73	2.8
34	4.3	74	2.8
35	4.4	75	2.2
36	5.1	76	2.3
37	4.8	77	2.1
38	5	78	1
39	4.6	79	0.8
40	4.6	80	0.4

## Resumen Estadístico para el Rendimiento

Recuento	80
Promedio	4.4025
Desviación Estándar	1.32817
Coefficiente de Variación	30.1686%
Mínimo	0.4
Máximo	6.8
Rango	6.4
Sesgo Estandarizado	-2.6293
Curtosis Estandarizada	0.890291

### El StatAdvisor

Esta tabla muestra los estadísticos de resumen para Rendimiento. Incluye medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma. De particular interés aquí son el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, las cuales pueden utilizarse para determinar si la muestra proviene de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar. En este caso, el valor de sesgo estandarizado no se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Ahmad M, Hirz M, Pichler H y Schwab H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(12):5301-5317.
- 2 Arredondo A, Orozco E, Duarte MB, Cuadra M, Recaman AL y Azar A. (2019). Trends and challenges in diabetes for middle-income countries: Evidence from Mexico. *Global Public Health*. 14(2):227-240.
- 3 Aw R, Barton GR y Leak DJ. (2017). Insights into the prevalence and underlying causes of clonal variation through transcriptomic analysis in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101(12):5045-5058.
- 4 Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS y Redwan EM. (2015). Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(7):953-962.
- 5 Baeshen MN, Bouback TA, Alzubaidi MA, Bora RS, Alotaibi MA, Alabbas OT y Baeshen NA. (2016). Expression and purification of C-peptide containing insulin using *Pichia pastoris* expression system. *BioMed Research International*. 2016.
- 6 Barraza-Lloréns M, Guajardo-Barrón V, Picó J, García R, Hernández C, Mora F y Urtiz A. (2015). Carga económica de la diabetes mellitus en México, 2013. México, DF: Funsalud. 2-127.
- 7 Barrigón JM, Montesinos JL y Valero F. (2013). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures?. *Biochemical Engineering Journal*. 75:47-54.
- 8 Bayraktar E. (2009). Effects of pH on human growth hormone production by *Pichia pastoris* considering the expression levels of regulatory genes. Middle East Technical University. Retrieved from <https://etd.lib.metu.edu.tr/upload/12610882/index.pdf>.
- 9 Beals JM, DeFelippis MR, Paavola CD, Allen DP, Garg A y Baldwin DB. (2019). Insulin. *Pharmaceutical Biotechnology*. pp. 403-427. Springer, Cham.
- 10 Bell GI, Swain WF, Pictet R, Cordell B, Goodman HM y Rutter WJ (1979). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin. *Nature*. 282(5738):525-527.
- 11 Best CH. (1956). The first clinical use of insulin. *Diabetes*. 5(1):65-67.
- 12 Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW y Falkow S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 2(2): 95-113.
- 13 Bracke A, Hoogewijs D y Dewilde S. (2018). Exploring three different expression systems for recombinant expression of globins: *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Spodoptera frugiperda*. *Analytical Biochemistry*. 543:62-70.
- 14 Braga A, Oliveira J, Silva R, Ferreira P, Rocha I, Kallscheuer N y Faria N. (2018). Impact of the cultivation strategy on resveratrol production from glucose in engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 265:70-75.
- 15 Brenner C y Fuller RS. (1992). Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(3):922-926.
- 16 Brierley RA, Bussineau C, Kosson R, Melton A y Siegel RS. (1990). Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 589(1):350-362.
- 17 Cai H, Zhang T, Zhao M, Mao J, Cai C y Feng F. (2017). Co-expression of lipase isozymes for enhanced expression in *Pichia pastoris*. *Letters in Applied Microbiology*. 65(4):335-342.



- 18 Çalık P, Ata Ö, Güneş H, Massahi A, Boy E, Keskin A y Özdamar TH. (2015). Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: from carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochemical Engineering Journal*. 95:20-36.
- 19 Çalık P, Çalık, G y Özdamar TH. (2000). Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 69(3):301-311.
- 20 Castillo Galván M. (2014). Análisis de la respuesta metabólica involucrada en la optimización de condiciones de cultivo para incrementar la producción de proteínas heterólogas en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- 21 Cereghino JL y Cregg, JM. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. 24(1):45-66.
- 22 Charoenrat T, Sangprapai K, Promdonkoy P, Kocharin K, Tanapongpipat S y Roongsawang N. (2015). Enhancement of thermostable  $\beta$ -glucosidase production in a slow methanol utilization strain of *Pichia pastoris* by optimization of the specific methanol supply rate. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 20(2):315-323.
- 23 Cho N, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW y MalandaB. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 138:271-281.
- 24 Cos O, Ramón R, Montesinos JL y Valero F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microbial Cell Factories*. 5(1):17.
- 25 Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY y Madden KR. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*. 5(12):3376-3385.
- 26 Cregg JM, Cereghino JL, Shi J y Higgins DR. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*. 16(1):23-52.
- 27 Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP y Stillman CA. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*. 9(3):1316-1323.
- 28 Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga AJ, Madden K y Chappell T. (2018). Expression of Recombinant Genes in the Yeast *Pichia pastoris*. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 17(1):e25.
- 29 D'anjou MC y Daugulis AJ. (2001). A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 72(1):1-11.
- 30 Danne T, Heinemann L y Bolinder J. (2019). New insulins, biosimilars, and insulin therapy. *Diabetes Technology and Therapeutics*. 21(S1):S-57.
- 31 Danne T, Lüpke K, Walte K, Von Schuetz W y Gall MA. (2003). Insulin detemir is characterized by a consistent pharmacokinetic profile across age-groups in children, adolescents, and adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 26(11):3087-3092.
- 32 Datar, R., Rosin, C.-G. 1990. Downstream process economics, pp.741-793. In: J. A. Asenjo (ed.), *Separation processes in biotechnology*, Marcel Dekker, New York.
- 33 De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J y Callewaert N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*. 27(6):561-566.
- 34 Dietzsch C, Spadiut O y Herwig C. (2011). A dynamic method based on the specific substrate uptake rate to set up a feeding strategy for *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*. 10(1):1-9.

- 35 Ding JG, Fei J, Cui DF y Zhang YS. (2005). Expression of monomeric insulin precursor in *Pichia pastoris* and its conversion into monomeric B27 Lys destripeptide insulin by tryptic hydrolysis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 37(4):234-240.
- 36 Dodson G y Steiner D. (1998). The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*. 8(2):189-194.
- 37 Dragosits M, Stadlmann J, Albiol J, Baumann K, Maurer M, Gasser B y Mattanovich D. (2009). The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Proteome Research*. 8(3):1380-1392.
- 38 Eurwilaichitr L, Roytrakul S, Suprasongsin C, Manitchotpisit P y Panyim S. (2002). Glutamic acid and alanine spacer is not necessary for removal of MF $\alpha$ -1 signal sequence fused to the human growth hormone produced from *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18(6) : 493-498.
- 39 Feng Y y Rangaiah GP. (2011). Evaluating capital cost estimation programs. *Chemical Engineering*. 118(8):22-29.
- 40 Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero JL, Vázquez E y Villaverde A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*. 8(1):1-8.
- 41 Flórez CEP, Chapman E, Panisset U, Arredondo A, Fitzgerald J y Reveiz L. (2016). Disponibilidad de indicadores para el seguimiento del alcance de la “Salud Universal” en América Latina y el Caribe. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 39:330-340.
- 42 Fuentes-Garibay JA, Aguilar CN, Rodríguez-Herrera R, Guerrero-Olazarán M y Viader-Salvadó JM. (2015). Tannase sequence from a xerophilic *Aspergillus niger* strain and production of the enzyme in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*. 57(5):439-447.
- 43 Fuller RS, Brake A y Thorner J. (1989). Yeast prohormone processing enzyme (*KEX2* gene product) is a Ca<sup>2+</sup>-dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86(5):1434-1438.
- 44 Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K y Villaverde A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microbial Cell Factories*. 7(1):1-18.
- 45 Gillies PS, Figgitt DP y Lamb HM. (2000). Insulin glargine. *Drugs*. 59(2):253-260.
- 46 Gluschkof P y Fuller RS. (1994). AC-terminal domain conserved in precursor processing proteases is required for intramolecular N-terminal maturation of pro-Kex2 protease. *The EMBO Journal*. 13(10):2280-2288.
- 47 Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R y Riggs AD. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76(1):106-110.
- 48 Gómez M y Rodríguez JC. (2008). The Emergence of Biotechnology Related Industries in Mexico. *Revista Nicolaita de Estudios Económicos*. 3(2):37-55.
- 49 Gong X, Ding C, Liu L y Wu J. (2013). Enhancement of human insulin precursor production by increasing the copy number in *Pichia pastoris*. *Wei sheng wu xue bao*. *Acta Microbiologica Sinica*. 53(6):545-552.
- 50 Guex N y Peitsch MC. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 18(15):2714-2723.
- 51 Guerrero-Olazarán M, Rodríguez-Blanco L, Carreon-Treviño JG, Gallegos-López JA y Viader-Salvadó JM. (2010). Expression of a *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(16): 5601-5608.
- 52 Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, Adnan A, Gäbel T, Chugh D y Rinas U. (2010). Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories*. 9(1):31.

- 53 Hang HF, Chen W, Guo MJ, Chu J, Zhuang YP y Zhang S. (2008). A simple unstructured model-based control for efficient expression of recombinant porcine insulin precursor by *Pichia pastoris*. Korean Journal of Chemical Engineering. 25(5):1065-1069.
- 54 Hazra P, Dave N, Kannan V, Tiwari S, Goel A, Iyer H y Patale MB. (2009). A method of obtaining purified heterologous insulins expressed in yeast. WO/2009/104199 A1.
- 55 Heinemann L. (2016). Biosimilar insulin and costs: what can we expect?. Journal of Diabetes Science and Technology. 10(2):457-462.
- 56 Heinemann L y Hompesch, M. (2014). Biosimilar insulins: basic considerations. Journal of Diabetes Science and Technology. 8(1):6-13.
- 57 Higgins DR y Cregg JM. (1998). Introduction to *Pichia pastoris*. In *Pichia* protocols (pp. 1-15). Humana Press.
- 58 Hilgenfeld R, Seipke G, Berchtold H y Owens DR. (2014). The evolution of insulin glargine and its continuing contribution to diabetes care. Drugs. 74(8):911-927.
- 59 Hirsch IB. (2005). Insulin analogues. New England Journal of Medicine. 352(2):174-183.
- 60 Hwang HG, Kim KJ, Lee SH, Kim CK, Min CK, Yun JM y Son YJ. (2016). Recombinant glargine insulin production process using *Escherichia coli*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 26(10):1781-1789.
- 61 Jahic M, Gustavsson M, Jansen AK, Martinelle M y Enfors SO. (2003). Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. Journal of Biotechnology. 102(1):45-53.
- 62 Jahic M, Veide A, Charoenrat T, Teeri T y Enfors SO. (2006). Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. Biotechnology Progress. 22(6):1465-1473.
- 63 Jia L, Shi Z, Yan J, Ding J y Hua Q. (2020). Enhancing heterologous proteins production by Mut<sup>s</sup> *Pichia pastoris* via periodic methanol induction control. AIChE Journal. 66(1):e16798.
- 64 Jian-Kun G, Shao-Xi C, Kai F, Qiang F, Hai-Rong C, Yi Z y Ying-Bin Y. (2008). Expression of human mini-proinsulin DesB (30) in *Pichia pastoris* and procedure for purifying the expression product. Progress in Biochemistry and Biophysics. 35(1):63-68.
- 65 Jiménez RL, Zambrano GH, Maldonado SI y Ramírez CTI. (2016). Percepción de la insulinoterapia en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 descontrolada. Atención Primaria. 48(8):543-549.
- 66 Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R y Thorner J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- $\alpha$ -factor. Cell. 37(3):1075-1089.
- 67 Juturu V y Wu JC. (2018). Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. ChemBioChem. 19(1):7-21.
- 68 Karamitsos DT. (2011). The story of insulin discovery. Diabetes Research and Clinical Practice. 93:S2-S8.
- 69 Karbalaee M, Rezaee SA y Farsiani H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. Journal of Cellular Physiology.
- 70 Katakura Y, Zhang W, Zhuang G, Omasa T, Kishimoto M, Goto Y y Suga KI. (1998). Effect of methanol concentration on the production of human  $\beta$ 2-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. Journal of Fermentation and Bioengineering. 86(5):482-487.
- 71 Keikha M. (2019). *Pichia pastoris* as One of the Best Choice for Expression of Biopharmaceutical Proteins. Letter to Editor. International Journal of Health and Life Sciences. 5(1).

- 72 Kim H, Yoo SJ y Kang HA. (2015). Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research*. 15(1):1-16.
- 73 Kjeldsen T, Balschmidt P, Diers I, Hach M, Kaarsholm NC y Ludvigsen S. (2001). Expression of insulin in yeast: the importance of molecular adaptation for secretion and conversion. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 18(1):89-121.
- 74 Kjeldsen T, Pettersson AF y Hach M. (1999a). Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 29(1):79-86.
- 75 Kjeldsen T, Pettersson AF y Hach M. (1999b). The role of leaders in intracellular transport and secretion of the insulin precursor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. 75(2-3):195-208.
- 76 Kjeldsen T. (2000). Yeast secretory expression of insulin precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54(3):277-286.
- 77 Kjeldsen T y Pettersson AF. (2003). Relationship between self-association of insulin and its secretion efficiency in yeast. *Protein Expression and Purification*. 27(2):331-337.
- 78 Korhola M y Nevalainen H. (1987). Industrial yeast genetics. In *Alko Symposium on Industrial Yeast Genetics (1987: Helsinki, Finland)*. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research.
- 79 Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS y Thornton JM. (2018). PDBsum: structural summaries of PDB entries. *Protein Science*. 27: 129-134.
- 80 Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangoan K, Suzara VV, Düzgüneş N y Renugopalakrishnan V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 142(2):105-124.
- 81 Liu WC, Inwood S, Gong T, Sharma A, Yu LY y Zhu P. (2019). Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Critical Reviews in Biotechnology*. 39(2):258-271.
- 82 Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A y Kovar K. (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnology Advances*. 33(6):1177-1193.
- 83 Love KR, Dalvie NC y Love JC. (2018). The yeast stands alone: the future of protein biologic production. *Current Opinion in Biotechnology*. 53:50-58.
- 84 Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B y Harvey LM. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 22(4):249-270.
- 85 Mansur M, Cabello C, Hernández L, País J, Varas L, Valdés J y Martínez E. (2005). Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*. 27(5):339-345.
- 86 Martínez JL, Liu L, Petranovic D y Nielsen J. (2012). Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*. 23(6):965-971.
- 87 Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M y Porro D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. *Recombinant Gene Expression* (pp. 329-358). Humana Press, Totowa, NJ.
- 88 Mesa J. (2015). New insulin types in type 1 diabetes mellitus. *Medicina Clínica (English Edition)*. 145(2):70-75.
- 89 Molina HS, Pérez IA, Alonso AA, Martínez JPD, Castellanos MP, del Valle Laisequilla CF y Alonso AA. (2015). Carga económica de la obesidad y sus comorbilidades en pacientes adultos en México. *Pharmacoeconomics Spanish Research Articles*. 12(4):115-122.
- 90 Morihara K, Oka T y Tsuzuki H. (1979). Semi-synthesis of human insulin by trypsin-catalysed replacement of Ala-B30 by Thr in porcine insulin. *Nature*. 280(5721):412-413.

- 91 Müller-II F, Tieke A, Waschik D, Mühle C, Müller F, Seigelchifer M y Gellissen G. (2002). Production of IFN $\alpha$ -2a in *Hansenula polymorpha*. *Process Biochemistry*. 38(1):15-25.
- 92 Nagel N, Graewert MA, Gao M, Heyse W, Jeffries CM, Svergun D y Berchtold H. (2019). The quaternary structure of insulin glargine and glulisine under formulation conditions. *Biophysical Chemistry*. 253:106226.
- 93 Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH y Makaroff LE. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 128:40-50.
- 94 Olsen JV, Ong SE y Mann M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular and Cellular Proteomics*. 3(6):608-614.
- 95 País JM, Varas L, Valdés J, Cabello C, Rodríguez L, Mansur M. (2003). Modeling of mini-proinsulin production in *Pichia pastoris* using the AOX promoter. *Biotechnology Letters*. 25(3):251-255.
- 96 País-Chanfrau JM, García Y, Licor L, Besada V, Castellanos-Serra L, Cabello CI, Martínez E. (2004). Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*. 26(16):1269-1272.
- 97 Perrin C, Ewen M y Beran D. (2017). The role of biosimilar manufacturers in improving access to insulin globally. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 5(8):578.
- 98 Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC y Ferrin TE. (2004). UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 25:1605-1612.
- 99 Petrides D, Sapidou E y Calandranis J. (1995). Computer-aided process analysis and economic evaluation for biosynthetic human insulin production: A case study. *Biotechnology and Bioengineering*. 48(5):529-541.
- 100 Polez S, Origi D, Zahariev S, Guarnaccia C, Tisminetzky SG, Skoko N y Baralle M. (2016). A simplified and efficient process for insulin production in *Pichia pastoris*. *PLoS One*. 11(12):e0167207.
- 101 Porro D, Sauer M, Branduardi P y Mattanovich D. (2005). Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*. 31(3): 245-259.
- 102 Potgieter TI, Kersey SD, Mallem MR, Nylen AC y d'Anjou M. (2010). Antibody expression kinetics in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*. 106(6):918-927.
- 103 Potvin G, Ahmad A y Zhang Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. *Biochemical Engineering Journal*. 64:91-105.
- 104 Resina D, Bollók M, Khatri NK, Valero F, Neubauer P y Ferrer P. (2007). Transcriptional response of *P. pastoris* in fed-batch cultivations to *Rhizopus oryzae* lipase production reveals UPR induction. *Microbial Cell Factories*. 6(1):21.
- 105 Rockwell NC, Krysan DJ, Komiyama T y Fuller RS. (2002). Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chemical Reviews*. 102(12):4525-4548.
- 106 Rockwell NC y Thorner JW. (2004). The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends in Biochemical Sciences*. 29(2):80-87.
- 107 Rosenfeld L. (2002). Insulin: discovery and controversy. *Clinical Chemistry*. 48(12):2270-2288.
- 108 Roth G, Vanz AL, Lünsdorf H, Nimtz M y Rinas U. (2018). Fate of the UPR marker protein Kar2/Bip and autophagic processes in fed-batch cultures of secretory insulin precursor producing *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*. 17(1):123.

- 109 Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S y Unwin N. IDF Diabetes Atlas Committee. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. Diabetes Research and Clinical Practice. 157:107843.
- 110 Safder I, Khan S, Islam IU, Ali MK, Bibi Z y Waqas M. (2018). *Pichia pastoris* expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. Biomedical Letters. 4(1):1-13.
- 111 Salamin K, Sriranganadane D, Léchenne B, Jousson O y Monod M. (2010). Secretion of an endogenous subtilisin by *Pichia pastoris* strains GS115 and KM71. Applied and Environmental Microbiology. 76(13):4269-4276.
- 112 Sánchez Rivero G. (2007). Historia de la diabetes. Gaceta Médica Boliviana. 30(2):74-78.
- 113 Schwarzhans JP, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T, Kalinowski J y Friehs K. (2016). Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. Microbial Cell Factories. 15(1):1-15.
- 114 Serrano-Rivero Y, Marrero-Domínguez K y Fando-Calzada R. (2016). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 47(2):67-77.
- 115 Sinha J, Plantz BA, Inan M y Meagher MM. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- $\tau$ . Biotechnology and Bioengineering. 89(1):102-112.
- 116 Soto-Estrada G, Moreno-Altamirano L y Pádua-Díaz D. (2016). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. Revista de la Facultad de Medicina (México). 59(6):8-22.
- 117 Sreekrishna K y Kropp KE. (1996). *Pichia pastoris*. In Nonconventional yeasts in biotechnology. pp. 203-253. Springer, Berlin, Heidelberg.
- 118 Sreekrishna K. (2010). *Pichia*, Optimization of Protein Expression Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology. pp 1-37.
- 119 Sreenivas S, Krishnaiah SM, Govindappa N, Basavaraju Y, Kanojia K, Mallikarjun N y Sastry KN. (2015). Enhancement in production of recombinant two-chain Insulin Glargine by over-expression of Kex2 protease in *Pichia pastoris*. Applied Microbiology and Biotechnology. 99(1):327-336.
- 120 Sreenivas S, Krishnaiah SM, Mohan AHS, Mallikarjun N, Govindappa N, Chatterjee A y Sastry KN. (2016). Disruption of *KEX1* gene reduces the proteolytic degradation of secreted two-chain Insulin glargine in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. 118:1-9.
- 121 Standl E. (2002). Insulin analogues–State of the art. Hormone Research in Pediatrics. 57(Suppl. 1):40-45.
- 122 Steiner DF y Oyer PE. (1967). The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 57(2):473.
- 123 Stratton J, Chiruvolu V y Meagher M. (1998). High cell-density fermentation. In *Pichia* protocols (pp. 107-120). Humana Press.
- 124 Takahashi S, Ueda M y Tanaka A. (2000). Effect of the truncation of the C-terminal region of Kex2 endoprotease on processing of the recombinant *Rhizopus oryzae* lipase precursor in the co-expression system in yeast. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 10(1-3):233-240.

- 125 Thim L, Hansen MT, Norris K, Hoegh I, Boel E, Forstrom J y Fiil NP. (1986). Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83(18):6766-6770.
- 126 Thongyoo S, Phakham T, Khongchareonporn N, Reamtong O, Karnchanatat A, Phutong S y Sooksai S. (2019). Expression, purification, and biological activity of monomeric insulin precursors from methylotrophic yeasts. *Protein Expression and Purification*. 153:35-43.
- 127 Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS y Walter P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101(3):249-258.
- 128 Tress M. (2013). Protein tertiary structures: prediction from amino acid sequences, in: eLS, John Wiley y Sons, Ltd, Chichester.
- 129 Vanz A, Lünsdorf H, Adnan A, Nimtz M, Gurramkonda C, Khanna N y Rinas U. (2012). Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high-level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microbial Cell Factories*. 11(1):1-11.
- 130 Viader-Salvadó JM, Cab-Barrera EL, Galán-Wong LJ y Guerrero-Olazarán M. (2006). Genotyping of recombinant *Pichia pastoris* strains. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 11(3):348-359.
- 131 Viader-Salvadó JM, Castillo-Galván M, Fuentes-Garibay JA, Iracheta-Cárdenas MM y Guerrero-Olazarán M. (2013b). Optimization of five environmental factors to increase beta-propeller phytase production in *Pichia pastoris* and impact on the physiological response of the host. *Biotechnology Progress*. 29(6):1377-1385.
- 132 Viader-Salvadó JM, Fuentes-Garibay JA, Castillo-Galván M, Iracheta-Cárdenas MM, Galán-Wong LJ y Guerrero-Olazarán M. (2013). Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) trypsinogen production in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Biotechnology Progress*. 29(1):11-16.
- 133 Viader-Salvadó JM, Gallegos-López JA, Carreón-Trevino JG, Castillo-Galván M, Rojo-Domínguez A y Guerrero-Olazarán, M. (2010). Design of thermostable beta-propeller phytases with activity over a broad range of pHs and their overproduction by *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(19):6423-6430.
- 134 Vinther TN, Kjeldsen TB, Jensen KJ y Hubálek F. (2015). The road to the first, fully active and more stable human insulin variant with an additional disulfide bond. *Journal of Peptide Science*. 21(11):797-806.
- 135 Vogl T, Gebbie L, Palfreyman RW y Speight R. (2018). Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*. 84(6).
- 136 Wahren J. (2004). C-peptide: new findings and therapeutic implications in diabetes. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. 24(4):180-189.
- 137 Wang J, Wang X, Shi L, Qi F, Zhang P, Zhang Y y Cai M. (2017). Methanol-independent protein expression by AOX1 promoter with trans-acting elements engineering and glucose-glycerol-shift induction in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*. 7:41850.
- 138 Wang J, Wang X, Shi L, Zhang Y, Zhou X y Cai M. (2018). Reduced methanol input induces increased protein output by AOX1 promoter in a trans-acting elements engineered *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 45(1):25-30.
- 139 Wang Y, Liang ZH, Zhang YS, Yao SY, Xu YG, Tang YH y Feng YM. (2001). Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnology and Bioengineering*. 73(1):74-79.

- 140 Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R y Schwede T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*. 46(W1):W296-W303.
- 141 Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB, Figueroa CA, Pessoa A y Farías JG. (2013). Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(4):1043-1048.
- 142 Werten MW, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H y de Wolf FA. (1999). High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*. 15(11):1087-1096.
- 143 Williams R, Karuranga S, Malanda B, Saeedi P, Basit A, Besançon S y Colagiuri S. (2020). Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 162:108072.
- 144 Wirtz V, Knox R, Cao C, Mehrtash H, Posner N y McClenathan J. (2016). Global market situation for insulin—the ACCISS study. Amsterdam: Health Action International.
- 145 Wong WKR, Ng KL, Sivakumar T, Hu XH, Wang H y Lai LCN. (2018). *Escherichia coli*: A Versatile Platform for Recombinant Protein Expression. In *The Universe of Escherichia coli*. IntechOpen.
- 146 Xie T, Liu Q, Xie F, Liu H y Zhang Y. (2008). Secretory expression of insulin precursor in *Pichia pastoris* and simple procedure for producing recombinant human insulin. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 38(3):308-317.
- 147 Yang S, Kuang Y, Li H, Liu Y, Hui X, Li P y Wu D. (2013). Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1' site. *PLoS One*. 8(9):e75347.
- 148 Yang Z y Zhang Z. (2018). Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnology Advances*. 36(1):182-195.
- 149 Zahrl RJ, Mattanovich D y Gasser B. (2018). The impact of ERAD on recombinant protein secretion in *Pichia pastoris* (syn *Komagataella* spp.). *Microbiology*. 164(4):453-463.
- 150 Zahrl RJ, Peña DA, Mattanovich D y Gasser B. (2017). Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*. 17(7):fox068.
- 151 Zavec D, Gasser B y Mattanovich D. (2020). Characterization of methanol utilization negative *Pichia pastoris* for secreted protein production: New cultivation strategies for current and future applications. *Biotechnology and Bioengineering* 117(5):1394-1405.
- 152 Zhang Y, Liu R y Wu X. (2007). The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Annals of Microbiology*. 57(4):553.
- 153 Zhu T, Guo M, Tang Z, Zhang M, Zhuang Y, Chu J y Zhang S. (2009). Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology*. 107(3):954-963.
- 154 Wong WKR, Ng KL, Sivakumar T, Hu XH, Wang H y Lai LCN. (2018). *Escherichia coli*: A Versatile Platform for Recombinant Protein Expression. In *The Universe of Escherichia coli*. IntechOpen.



## 13 RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Abel Caballero Pérez

Candidato para el grado de

Doctor en ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: OBTENCIÓN DE LA INSULINA HUMANA EN CEPAS DE *Pichia pastoris*

Campo de estudio: Biotecnología Molecular y Bioprocesos con OGMs.

Datos personales: Nacido en La Habana, Cuba, el 25 de julio de 1967. Hijo de Orlando Caballero Rizo y Zoraida Pérez Sarmiento.

Educación. Egresado de la Universidad de La Habana, La Habana, Cuba. Maestría de los procesos Biotecnológicos, Universidad politécnica José Antonio Echevarría, La Habana, Cuba.

Experiencia profesional: Tecnólogo del Instituto de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba. Maestro en la Facultad de estudios profesionales zona Huasteca. UASLP, SLP, México.